

**Die Rolle des Gens *flipflop* in der frühen Morphogenese  
des Mehlkäfers *Tribolium castaneum***

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Susanne Thümecke

aus Rostock

Rostock, 16.12.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Schröder  
Abt. Genetik  
Institut für Biowissenschaften  
Universität Rostock

2. Gutachter: PD Dr. Michael Schoppmeier  
Abt. Entwicklungsbiologie  
Institut für Biologie  
Universität Erlangen-Nürnberg

Datum der Einreichung: 16.12.2016

Datum der Verteidigung: 03.02.2017



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1. Einstülpung vs. Ausstülpung - Epitheliale Morphogenese im Modell	4
1.2. Die Familie der Rho-GTPasen bei der epithelialen Morphogenese	6
1.3. Nichtkanonische Wnt-Signalwege und Planare Zellpolarität (PCP)	7
1.4. Neue verwaiste Gene	9
Zielstellung	10
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1. Geräte und Chemikalien	11
2.2. Tierzucht	16
2.2.1. Tierstämme	16
2.3. Genamplifikation	16
2.4. RACE - PCR	17
2.5. Genannotation und Analyse	17
2.6. RNA-Präparation	17
2.7. Parentale RNAi	18
2.8. Embryonale RNAi und Live-Imaging	18
2.9. Kutikulapräparation	19
2.10. Fixierung von Embryonen	19
2.11. <i>Whole mount in situ</i> Hybridisierung	19
2.12. Antikörpernachweis	20
2.13. Phalloidin-färbung (F-Actin Labeling)	21
2.14. Herstellung von Semidünnschnitten	21
2.15. Western Blot	21
2.15.1. Proteinextraktherstellung	21
2.15.2. Western Blot und Proteinnachweis	22
2.16. Mikroskopie und Bildbearbeitung	22
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1. Funktionelle Analyse von <i>Tc-flipflop1</i> und <i>Tc-flipflop2</i>	24
3.1.1. Genmodell	24
3.1.2. Expressionsnachweis von <i>Tc-flipflop</i>	24
3.1.3. Proteinnachweis	25
3.1.4. Phänotypische Analyse nach <i>Tc-flipflop</i> RNA-Interferenz	27
3.1.4.1. Phänotypische Ausprägungen larvaler Kutikulas	27
3.1.4.2. Embryonale Morphologie	33



## Inhaltsverzeichnis

3.1.5. Programmierter Zelltod (Apoptose)	35
3.2. Funktionelle Analyse von <i>Tc-RhoGEF2</i>	37
3.2.1. Genmodell	37
3.2.2. Expressionsnachweis von <i>Tc-RhoGEF2</i>	38
3.2.3. Phänotypische Analyse nach <i>Tc-RhoGEF2</i> RNA-Interferenz	39
3.2.4. Embryonale Morphologie	41
3.2.5. Programmierter Zelltod (Apoptose)	41
3.2.6. Doppel-Knockdown von <i>Tc-flipflop</i> und <i>Tc-RhoGEF2</i>	43
3.2.7. Weitere Rho-assoziierte Kandidaten	46
3.3. Analyse von Kandidaten des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs	48
3.3.1. Tyrosin-Proteinkinase Transmembranrezeptor <i>Tc-Ror1</i>	48
3.3.2. Weitere Kandidaten des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs	50
3.3.3. Ryk-like Tc-Cad96Ca	51
3.3.4. <i>Tc-dishevelled</i> ( <i>Tc-dsh</i> )	51
3.4. Zinkfinger <i>Tc-zfx</i>	53
3.5. <i>Tc-Cholin-Dehydrogenase</i> ( <i>Tc-cdh</i> )	54
3.6. <i>Tc-DEAF1</i> und andere Kandidaten	57
3.7. Kontrollversuch mittels <i>Tc-distalless</i> ( <i>Tc-dll</i> ) RNAi	58
<b>4. Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1. Das Waisenkind <i>flipflop</i>	61
4.2. Direktionalität und Zelltod in der Embryonalentwicklung	65
4.3. <i>RhoGEF2</i> und <i>flipflop</i> sind essentiell für die Direktionalität epithelialer Morphogenese	68
4.4. Rho-assoziierte Kandidaten	72
4.5. Direktionalität im nichtkanonischen Wnt-Signalweg	74
4.6. Die Transkriptionsfaktoren ZFX und DEAF-1	79
4.7. Cholindehydrogenase <i>Tc-cdh</i>	80
<b>Ausblick</b>	<b>82</b>
<b>I. Danksagung</b>	<b>83</b>
<b>II. Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>III. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>IV. Anhang</b>	<b>95</b>
1. Abkürzungsverzeichnis	95
2. Zusätzliche Tabellen	99
3. Eidesstattliche Erklärung	108

### Zusammenfassung

Die frühe Beinentwicklung während der Embryogenese des Mehlkäfers *Tribolium castaneum* beruht auf der Evagination des Gewebes in definierten Regionen entlang der anterior-posterioren Achse. Die so gebildete Extremitätenknospe wächst dann im weiteren Verlauf der Embryogenese durch weitere Zellteilungen, gerichtete Zellbewegungen und Zellformänderungen nach distal aus. Bisher wurde bereits eine Vielzahl von Genen identifiziert, die für das Wachstum und die Formgebung des *Tribolium*-Beins verantwortlich sind. Die zellbiologischen und molekularen Mechanismen, die das primäre distale Auswachsen der Beinanlage verursachen, sind jedoch nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurden erstmals Faktoren identifiziert, die das gerichtete Auswachsen von Beinen und Kopfanhängen (Evagination) maßgeblich steuern: die Gene *Tc-flipflop1* (*Tc-ff1*) und *Tc-flipflop2* (*Tc-ff2*). Beides sind kurze Gene ohne bekannte konservierte Domänen oder Homologe in anderen Organismen. Ein Knockdown der *Tc-flipflop* Gene durch RNAi führt zur Einstülpung der embryonalen Extremitätenknospe und zur Bildung der Körperanhänge im Inneren der Larve. Ebenso traten weitere Phänotypen wie unvollständiger Rückenschluss und Bildungsdefekte der extraembryonalen Membranen auf. Mit der Identifikation weiterer Gene mit gleichem Knockdown-Phänotyp konnten die *Tc-flipflop* Gene in Rho-assoziierte, nichtkanonische Wnt-Signalwege eingeordnet werden.

## 1. Einleitung

### 1.1. Einstülpung vs. Ausstülpung - Epitheliale Morphogenese im Modell

*"All limbs are not the same."* (Christen & Slack, 1998)

Der generelle Bauplan der Arthropodenextremitäten und für deren Anlage, Entwicklung und Differenzierung zuständige Entwicklungsgene sind evolutionär hoch konserviert (Abzhanov & Kaufman, 2000; Beermann et al., 2001; Cohen, 1990; Lewis, 1978; Stuart et al., 1991). Dennoch sind einige Mechanismen wie Beinentscheidung nicht identisch. So unterscheiden sich die ersten Schritte der Beinentwicklung bei den holometabolen Insekten, der Taufliege *Drosophila melanogaster* und die des Rotbraunen Mehlkäfers *Tribolium castaneum*, grundlegend. Während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* invaginieren die Anlagen der Strukturen wie Beine, Flügel und Mundwerkzeuge und entwickeln sich als Imaginalscheiben im Inneren der Larve. Dies stellt eine evolutionär abgeleitete Form der Entwicklung von Körperanhängen dar. Weitaus häufiger - und neben fast allen Arthropoden auch in Vertebraten zu sehen - ist jedoch die Evagination der Extremitätenknospe, die durch kontinuierliches Wachstum eine Körperanhangsstruktur bildet. Nach diesem Prinzip entwickeln sich auch die Extremitäten in *Tribolium castaneum*. *Tribolium* zeichnet sich durch unkomplizierte Haltung und eine kurze Generationszeit aus. Neben *Drosophila* wurde dieses Insekt durch die Entwicklung von Methoden zur Untersuchung von Genfunktionen, des Live-Imaging, transgenen Techniken und der Sequenzierung seines Genoms als weiterer Modellorganismus für entwicklungsbiologische Fragestellungen etabliert (Brown et al., 2009; Richards et al., 2008; Schröder et al., 2008). Eine Methode, um Genfunktionen in *Tribolium* zu analysieren stellt die RNA Interferenz (RNAi) dar. Die Methode der RNAi beruht auf dem posttranskriptionellen Genknockdown mithilfe einer Doppelstrang-RNA (dsRNA), deren Sequenz spezifisch für ein Fragment des Zielgens ist. Dies hat den Abbau komplementärer mRNA zur Folge und das Protein wird nicht translatiert. Der Vorteil dieser Anwendung in *Tribolium* ist die systemische Verbreitung injizierter RNA in alle Gewebe, einschließlich der Gonaden. So können Knockdown-Effekte in den Nachkommen analysiert werden, ohne Mutationslinien generieren zu müssen. Zum Ausschluss von Off-target Effekten und um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen werden nicht-überlappende Fragmente (NOFs) generiert und hinsichtlich ihrer Knockdown-Effekte verglichen.

Generell basiert das formgebende Auswachsen von epithelialen Geweben auf dynamischen Prozessen, welche die Fähigkeit der polarisierten Zellwanderung und Zellformveränderung

## Einleitung

zur Voraussetzung haben. Dies gilt z.B. für das Auswachsen einer Struktur wie dem Bein, die nach Innen gerichtete Furchenbildung bei der Gastrulation und die planare Fusion eines Gewebes, also die aufeinander zugerichtete Bewegung zweier Epithelien in einer Ebene, wie des Rückenschlusses. Epitheliale Gewebe werden als in einer Fläche angeordnete adhärente Zellen mit apiko-basaler Polarität primär über Adherens Junctions miteinander verbunden (Kondo & Hayashi, 2015). Adherens Junctions sind als Proteinkomplexe mit dem Cytoskelett und Septate Junctions (in Arthropoden, Tight Junctions in Vertebraten) verbunden (Anderson et al., 2004; Furuse & Tsukita, 2006; Kondo & Hayashi, 2015). Damit sich ein Epithel nach außen stülpt, wird in diesem Bereich eine Spannung durch Zellformveränderung aufgebaut. Die Zellen werden an der Innenseite verengt (basale Konstriktion) und gegebenenfalls apikal geweitet. Damit ein Gewebe invaginieren kann ziehen sich die Zellen an der Außenseite zusammen (apikale Konstriktion) und werden nach basal weiter (Lewis, 1947). Im Gegensatz zu In- und Evagination zeichnet sich der planare Zusammenschluss eines Epithels, wie der Dorsalschluss, vor allem durch die Verbreiterung der Zellverbände aus, welche ein polarisiertes Migrationsverhalten der Zellen an den vorderen Kanten (*leading edge cells*) zur Voraussetzung haben (Harden, 2002). Der Dorsalschluss in *Drosophila* ist als Modell dynamischer Zellmorphogenese bereits gut untersucht und prinzipiell auf ähnliche Prozesse wie z.B. die Wundheilung in Vertebraten übertragbar. Die im Dorsalschluss entstehenden Gewebespannungen sind dabei nicht nur von epidermalemem Gewebe abhängig, sondern involvieren auch die extraembryonalen Membranen, welche den Embryo bis zu diesem Zeitpunkt umschließen. Dieses Gewebe, welches letztlich im Dorsalschluss vom embryonalen Gewebe eingeschlossen wird, besteht bei *Drosophila* aus einer reduzierten Amnioserosa. *Tribolium* weist, wie andere Insekten, zwei extraembryonale Membranen, Amnion und Serosa, auf (Panfilio et al., 2013). Damit der Dorsalschluss vollzogen werden kann, muss sich extraembryonales Gewebe an der ventralen Seite des Embryos lösen, um nach dorsal gezogen zu werden. Es wurde gezeigt, dass diese Ruptur aktiv vom Amnion durchgeführt wird, während die Serosa kontrahiert und die Gewebe letztlich als Dorsalorgan vom embryonalen Epithel eingeschlossen werden (Hilbrant et al., 2016).

Allen diesen Mechanismen, ob Gewebefaltung oder -zusammenschluss, geht der Aufbau einer kontraktilen Spannung des Cytoskeletts voraus, welcher vor allem auf Interaktionen von Aktin und Myosin beruht. Für die Stabilität eines Zellverbandes ist darüber hinaus der Aufbau von Zell-Zell Adhäsion notwendig. Essentielle Regulatoren sind hierbei die Zell-Adhäsions-Rezeptoren der Cadherin- und Immunoglobulin- Superfamilien, welche hoch

konserviert sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten zu finden sind (Hill et al., 2001; Hynes & Zhao, 2000). Allein in *Drosophila* wurden mindestens 17 Cadherine identifiziert (Hill et al., 2001). Klassische Cadherine sind Transmembranproteine mit einer extrazellulären Cadherin-Domäne, welche Zell-Zell-Kontakte herstellt, sowie einer intrazellulären Domäne, die mit anderen Proteinen wie Catenin interagiert. Catenine sind mit dem Cytoskelett assoziiert und regulieren so die Cadherin-Aktivität.

### **1.2. Die Familie der Rho-GTPasen bei der epithelialen Morphogenese**

Die Ausbildung und Formgebung von Gewebe beinhaltet das komplexe Zusammenspiel morphogenetischer Ereignisse, hervorgerufen durch eine Vielzahl räumlich und zeitlich gesteuerter Signalwegskomponenten. Für den Aufbau und die (Re-) Organisation des Aktin-Cytoskeletts, was die entscheidende Kraft hinter diesen zelldynamischen Ereignissen darstellt, ist die Familie der Rho-GTPasen maßgeblich verantwortlich (Braga, 1999; Kaibuchi et al., 1999; Nobes & Hall, 1994; Nobes & Hall, 1995). Rho-GTPasen, wie Rho, Rac und Cdc42, regulieren Aktin-Myosin II Bildung, Zell-Zell Adhäsion, Polarität, Zellmigration und -motilität (Kaibuchi et al., 1999; Nobes & Hall, 1994; Schlessinger et al., 2009). Entsprechend ihrer Funktionen sind sie membranassoziiert und agieren dort, je nach Funktion und beteiligter Signalmoleküle, in unterschiedlichen Signalkaskaden. Dabei fungieren sie als molekulare Schalter, wobei sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand alternieren. Die Regulation des aktiven und inaktiven Zustands dieser Proteine erfolgt über GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) und GAPs (GTPase activating Protein). Während GAPs die inaktive Form gewährleisten, besitzen GEFs aktivierende Funktion. Ein für Prozesse der Zellformveränderung essentielles Signalmolekül ist RhoGEF2. Dieses steuert die Regulation von Actomyosin-Kontraktilität, den Bindungs-Ab- und Wiederaufbau zwischen Actomyosin und Adherens Junctions, sowie die Initiierung apikaler Konstriktion (Barrett et al., 1997; Häcker & Perrimon, 1998; Kölsch et al., 2007; Lecuit & Lenne, 2007; Padash Barmchi et al., 2005). Letztere beschreibt das Zusammenziehen von Zellen an der Außenseite, welches die Invagination eines Gewebes erst ermöglicht. RhoGEF2 ist ein hochkonserviertes GEF, welches Proteine der Rho-GTPasen Familie reguliert (Barrett et al., 1997). GEFs besitzen mindestens eine konservierte, ca. 200 Aminosäuren lange Dbl homology (DH) Domäne, auch als RhoGEF-Domäne bezeichnet, welche in der Regel mit einer Pleckstrin homology (PH) Domäne co-lokalisiert ist (Manser,

2005). In *Drosophila* ist *Dm-RhoGEF2* ubiquitär in den apikalen Bereichen von Epithelzellen exprimiert (Kölsch et al., 2007; Padash Barmchi et al., 2005) und essentiell für die Bildung der Ventralfurche, als auch für den Dorsalschluss. Der Verlust von *Dm-RhoGEF2* führt dazu, dass die Ventralfurche nicht mehr gebildet wird und Öffnungen auf der dorsalen Seite der Kutikula zurückbleiben (Häcker & Perrimon, 1998). Es gibt eine Vielzahl an GEFs, welche dementsprechend an mehreren Morphogeneseaspekten von Zellverhalten beteiligt sind. Allein im Humangenom sind ca. 80 GEF-Gene vorhanden (Goicoechea et al., 2014). Die meisten GEFs können mit mehreren unterschiedlichen Proteinen der Rho-Familie interagieren (Machesky & Hall, 1996). Beispielsweise sind die GEFs RhoGEF64C und Trio mitverantwortlich für die Zellmigration und die Ausbildung von Lamellipodien, um die nötige Zellmotilität zu gewährleisten (Bakal et al., 2007; Bashaw et al., 2001; Lanier & Gertler, 2000).

Rho-Signaltransduktion interagiert während morphogenetischer Prozesse in der Regel mit anderen Komponenten der Jun-n-terminalen-Kinase (JNK-), G-Protein-gekoppelter (GPCR) oder nichtkanonischer Wnt-Signalwege (Cadigan & Nusse, 1997; Harden, 2002; Kerridge et al., 2016; Nomachi et al., 2008).

### **1.3. Nichtkanonische Wnt-Signalwege und Planare Zellpolarität (PCP)**

Die Wnt-Familie gehört zu den Hauptakteuren entwicklungsbiologischer Prozesse, bestimmt Zellschicksale, Zellformveränderungen und beeinflusst Zellpolarität (Cadigan & Nusse, 1997; Ho et al., 2012). Die Terminologie der Wnt Gene basiert auf dem erstbeschriebenen Gen *Wnt-1* (*Drosophila wingless* (*wg*) und Maus *int-1*) (Cadigan & Nusse, 1997). Im Menschen wurden 19 Wnt-Gene identifiziert, in *Tribolium* neun (Bolognesi et al., 2008a; Bolognesi et al., 2008b; Niehrs, 2012). Je nach Art der Signaltransduktion werden kanonische ( $\beta$ -Catenin-abhängige) und nichtkanonische ( $\beta$ -Catenin-unabhängige) Signalkaskaden unterschieden. Während kanonische Wnts via der Transmembranrezeptoren Frizzled und LRP als Transkriptionsregulatoren agieren, ist die Rolle nichtkanonischer Wnt-Signale aufgrund der unterschiedlich involvierten Downstream-Kaskaden noch wenig verstanden. Als Rezeptoren nichtkanonischer Wnt-Kaskaden wurden Transmembran-Rezeptor Tyrosinkinasen (RTKs) wie Ror (Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Rezeptor), Ryk (Receptor Tyrosin Kinase), Ptk7 (Protein-Tyrosine Kinase) und Musk (Muscle Skeletal Receptor Tyrosine Kinase) identifiziert (Green et al., 2014; Niehrs, 2012; Schlessinger et al., 2009).

## Einleitung

Diese regulieren über Rho-assoziierte GTPasen Cytoskelettdynamik-basierte Morphogenese und gerichtete Zellbewegung mittels planarer Zellpolarität (PCP) und konvergenter Extension (CE). Während PCP die Polarität von Gewebe in der Fläche bestimmt, beschreibt CE die aktive Streckung und gleichzeitige Stauchung von Zellen in dieser Ebene (Keller et al., 2000; Tada & Kai, 2009; Zhou et al., 2015).

Die Beteiligung nichtkanonischer Wnt-Signalwege an der Evagination von Geweben, wie auch der Beinentwicklung, wird für Vertebraten als auch *Hydra* bereits vermutet, jedoch sind die Prozesse für die Initiation noch nicht verstanden. Wnt- in Kombination mit FGF- (Fibroblast Growth Factor) und MAPK- (Mitogen-Activating Protein Kinase) Komponenten sind hierbei für die Ausrichtung der Polarität und das proximal-distale Auswachsen verantwortlich (Green et al., 2008; Gros et al., 2010; Philipp et al., 2009). Als beteiligte Rezeptoren wurden hierbei Ror und Ryk identifiziert, wobei Wnt5a als Ligand dient (Green et al., 2014; Gros et al., 2010; Hopyan et al., 2011). In *Tribolium* wurde bereits der Einfluss des kanonischen Wnt-Signalwegs via der Rezeptoren Frizzled und LRP untersucht. Dabei wurden für einen kombinierten Knockdown der Rezeptoren *Tc-Frizzled 1* und *Tc-Frizzled 2* Defekte in der Beinentwicklung beschrieben (Beermann et al., 2011). Der nach außen gerichtete Auswuchs der Extremitäten ist hierbei jedoch nicht betroffen. Für die Festlegung der proximal-distalen Achse des Beins sind Gene verantwortlich, die zu einem früheren Zeitpunkt der Embryogenese in den Beinanlagen exprimiert werden. Einen essentiellen Faktor für die Positionsinformation der Anlagen stellt das Gen *distalless* (*dll*) dar (Cohen, 1990). Die Lokalisation von *distalless* wird dabei via Wnt-, Dpp- und Hedgehog- Signalen vorgegeben, während die spätere Segmentierung von homeotischen Genen reguliert wird. In *Tribolium* führt der Knockdown von *Tc-dll* zu verkürzten Bein- und Kopfanhängen, wobei im Extremfall nur noch die basal-proximalen Segmente gebildet werden (Beermann et al., 2001). Dennoch werden Körperanhangsstrukturen primär ausgebildet. Daher stellt sich die Frage nach bisher unbekannten Faktoren, welche von Beginn an das Ausstülpfen dieser Strukturen bestimmen. Es gibt bereits morphogenetische Beschreibungen, welche Voraussetzungen für die Faltung eines Gewebes gegeben sein müssen (siehe oben). Die treibenden Kräfte dieser Prozesse sind bisher aber noch nicht verstanden. Einen ersten Hinweis auf die genetischen Grundlagen der Beinausstülpung geben die Gene *Tc-flipflop1* und *Tc-flipflop2*. Diese wurden, basierend auf dem *flipflop* RNAi Phänotyp des iBeetle-Projekts, als neue Gene in *Tribolium* identifiziert und in dieser Arbeit analysiert.

### 1.4. Neue verwaiste Gene

Können neue Gene aufgrund ihrer unbekannten Zugehörigkeit nicht eingeordnet werden, bezeichnet man sie häufig als Orphan-Gene (Gentile et al., 2011). Orphan- („Waisenkind“) Gene zeichnen sich durch das Nichtvorhandensein jeglicher Homologie zu Genen in anderen Abstammungslinien aus. Dies macht es unmöglich, solche Gene bezüglich ihrer Struktur und Funktion mit Genen anderer Organismen zu vergleichen (Tautz & Domazet-Lošo, 2011). Sie sind oft gekennzeichnet durch kurze ORFs (*open reading frame*, Leserahmen), wenige Exons, ein niedriges Expressionslevel und X-chromosomale Lokalisation (Palmieri et al., 2014; Schlötterer, 2015). Darüber wie ein neues Gen entstanden sein kann gibt es einige Theorien: Duplikation durch Rekombination, Gen-Fusion/Teilung, Neukombination von Exons, Retroposition, horizontaler Gentransfer, oder *de novo* durch zuvor nicht-kodierende Sequenzen sind hierbei die am häufigsten genannten Mechanismen (Long et al., 2003; Prabh & Rodelsperger, 2016; Tautz & Domazet-Lošo, 2011; Wissler et al., 2013). Bei der Retroposition wird die prozessierte mRNA eines Gens durch reverse Transkription in cDNA übersetzt und in das Genom integriert. Diese neuen Gene zeichnen sich zunächst durch das Fehlen von Introns und regulatorischen Elementen aus, weshalb sie, bis zur Entdeckung funktioneller Retroposons, als Pseudogene bezeichnet wurden (Kaessmann, 2010; Kaessmann et al., 2009).

Über die tatsächlichen Entstehungsmechanismen von Orphan-Genen ist nicht viel bekannt, da bisher nur wenige auch funktionell untersucht worden sind. Man scheint sich jedoch einig darüber zu sein, dass die Evolution von neuen Genen entscheidend ist für die Entwicklung neuer Funktionen im Zuge von Selektionsdruck (Long et al., 2003).



### Zielstellung

In dieser Arbeit soll das neue Gene *Tc-flipflop1* hinsichtlich seiner funktionellen Bedeutung für die frühe Morphogenese des Modellorganismus' *Tribolium castaneum* eingeordnet werden. Um das Gen auf molekularer Ebene zu charakterisieren wurde seine genomische Organisation ermittelt und die Exon-Intron Struktur durch die Sequenzierung von mehreren unabhängigen cDNA-Klonen dargestellt. Mittels Homologie-Suche in Genomen von verschiedenen Insektenarten sollte ein Einblick in die Variabilität dieses Gens im evolutionären Zusammenhang gewonnen werden.

Weiterhin sollte die Funktion von *Tc-flipflop* mithilfe der RNA-Interferenz (RNAi) Methode bei zellmorphologischen Prozessen wie der Evagination der Beinanlage analysiert werden. Dafür wurden Embryonen und Larven mit dem *flipflop*-RNAi-Phänotyp hinsichtlich der zellulären Morphologie, der Dynamik der beteiligten Gewebe in sich entwickelnden RNAi-Embryonen und der Expression von verschiedenen Markergenen analysiert.

Um eine Beteiligung des Gens *flipflop* bei bekannten Signalwegen festzustellen, war die Identifikation weiterer Kandidatengene entscheidend. Die Auswahl dieser Kandidaten erfolgte in zwei verschiedenen Ansätzen. Zum einen wurden evolutionär konservierte Gene ausgewählt, deren Beteiligung bei der Morphogenese von Epithelien in anderen Modellorganismen wie *Drosophila* bereits in der Literatur beschrieben wurden. Dazu wurden hauptsächlich Komponenten von Signalwegen gewählt, die in ähnliche morphogenetische Prozesse der Embryonalentwicklung involviert sind. Zum anderen wurde die iBeetle-Datenbank gezielt nach RNAi-Phänotypen durchsucht, die einen oder mehrere Aspekte des "*flipflop*-Syndroms" wie invaginierte Extremitäten, ein invertiertes Abdomen oder Defekte beim Rückenschluss aufwiesen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte und Chemikalien

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung/Firma</b>
Analysesiebe, Maschenweite 300 µm	Haver & Boecker
Analysesiebe, Maschenweite 710 µm	Haver & Boecker
Artemiensiebe	Dohse Aquaristik KG
Auffangschalen	Haver & Boecker
AxioImager Z.1 Mikroskop	Zeiss
Axioplan 2 Mikroskop	Zeiss
AxioVision 4.8.1 Software	Zeiss
Binokular EZ4	Leica
Binokular Stemi 2000-C	Zeiss
Binokularlampe KL 1500 LCD	Zeiss
Deckgläschen, 18 x 18 mm	Roth
Drehrad	H. Saur
Electrophorese Power Supply	Consort, Peqlab, BioRad
Elektrophoresekammer	Peqlab
Feinwaage CP224S	Sartorius
Fliegenröhrchen	Greiner
Flow-Bench LaminAir HB 2460	Heraeus
Geldokumentation TFX-40M	Vilber Lourmat
Gelkämme	Peqlab
Gelschlitten	Peqlab
Glaskolben 250 ml	Schott
Heizblöcke	Hartenstein (TDB-100), Sigma-Aldrich (DB-3D), VWR, Enda
Holzpinsel	Fackelmann
Inkubatoren	Binder, Heraeus, Thermo Scientific
Käferboxen mit Deckel (2,5 l)	Curver
Kamera PowerShot G5	Canon
Kapillar- und Nadelhalter	Starrett
Kapillarnadelziehgerät K E Puller	H. Saur
Kunststoffmessbecher (2 l)	Hartenstein

## Material und Methoden

Mikroskop-Kameras	Jenoptic (ProgRes C14), 2 MP Monochrome (Diagnostic Instruments), Zeiss (AxioCam MRc, MRm)
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab
Objektträger, weiß, 76 x 26 mm	Hartenstein
PCR-Cycler	Eppendorf (Master gradient), Peqlab (peqSTAR 96X Universal Gradient)
Pipetten	Eppendorf Research, Greiner
Pipettierhilfe „Pipetus“	Hirschmann Laborgeräte
Quarzküvette	Hellma
Stopfen für Fliegenröhrchen	Greiner
Skalpelle	VEB MLW Medizinmechanik Sohl
Spektralphotometer BioMate 3	Thermo Spectronic
Thermostatschrank	Lovibond
UV-Brille	Pullsafe
UV-Lampe HXP 120	Kübler Codix
Vortex-Mixer	IKA, Bender & Hobein AG
Waage BL610	Sartorius
Wasserbad A 100	Lauda
Zentrifugen	Heraeus, Techne Cambridge

### Verbrauchsmaterial

Material	Bezeichnung/Firma
Bierhefe	Cenovis
Chlorix	DanKlorix
Einmalpipetten	Sarstedt
Einwegkanülen, 0,9 x 40 mm	Braun
Einwegspritzen, 20 ml	Braun
Falcontubes, 15 ml, 50 ml	Greiner
Glaskapillaren, 1 x 100 mm	Kwik-Fil
Handschuhe, Latex, Puder-frei	Sänger
Handschuhe, Nitril	Roth
Indikatorstäbchen pH-Fix	Macherey-Nagel
Mehl	
Instantmehl Typ 405	Aurora
Vollkornweizenmehl	Alnatura
Weizenmehl Typ 550	realBio

## Material und Methoden

Papiertücher	Laboraausstattung M. Schmehl
Papiertücher fein	Laboraausstattung M. Schmehl
Parafilm	Aldrich
Pasteurpipetten	Hartenstein
Petrischalen, 55 x 15 mm	Hartenstein
Petrischalen, 94 x 16 mm	Hartenstein
Pipettenspitzen	Eppendorf, Greiner
Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Hartenstein
Eppendorf Safe-Lock Gefäß™, 1,5 ml	Eppendorf
Wägeschälchen	Roth

## Chemikalien & Molekularbiologische Substanzen

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
Agar-Agar	Roth
Agarose	Cambrex
Ammoniumacetat	Thermo Fisher Scientific
Ampicillin	AppliChem
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragments	Roche
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	AppliChem
Chloralhydrat	Roth
DAPI	Biotium
DIG RNA Labeling Mix, 10x	Roche
dNTP-Mix (PCR)	NEB
D-(+)-Saccharose	AppliChem
<i>Eco</i> RI-Puffer, 10x	NEB
EDTA	AppliChem
Essigsäure, 100 %	AppliChem
Ethanol, absolut	AppliChem
Ethidiumbromid	AppliChem
Fast Digest 10x Puffer	NEB
Fluorescein Phalloidin	Molekular Probes™
Formaldehyd, 37 %	Roth
Formamid, deionisiert	AppliChem
Gene Ruler 1 kb Leiter	Thermo Fisher Scientific

## Material und Methoden

Glycerin, wasserfrei, 100 %	AppliChem
Gummi arabicum	Roth
Hefeextrakt	Roth
Hoechst 33342	Applichem
Isopropanol	Roth
L-(+)-Milchsäure	AppliChem
Lithiumchlorid	AppliChem
Magnesiumchlorid	AppliChem
Methanol	AppliChem
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	VEB Laborchemie Apolda
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat)	Roth
Natriumchlorid	AppliChem
NBT/BCIP Stock Solution	Roche
n-Heptan	AppliChem
nukleasefreies Wasser	Ambion
Paraformaldehyd	Sigma
Pertex	Medite GmbH
Pepton	Roth
Salzsäure, rauchend, 37 %	AppliChem
Thermo Pol Buffer (PCR)	NEB
TRIS	Roth
Triton-X-100	AppliChem
Tween 20	AppliChem

### Enzyme

Enzym	Firma
<i>EcoRI</i> -HF <sup>TM</sup>	NEB
Lysozym	Serva
<i>HindIII</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Roche
RNase A	Roth
<i>SpeI</i>	Thermo Fisher Scientific
T3-RNA-Polymerase	Roche
T7-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Roche
<i>taq</i> -Polymerase	NEB
TURBO-DNase	Thermo Fisher Scientific

## Material und Methoden

### Lösungen

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Breaking-Buffer	100 mM Tris-HCL (ph 7,5), 200 mM NaCl, 5 % Glycerin, 5 mM EDTA
Färbepuffer	0,1 M TRIS (pH 9,5), 0,05 M MgCl <sub>2</sub> , 0,1 M NaCl, 0,1 % Tween 20
Fixierungslösung	1,33 M Paraformaldehyd, 0,12 M Saccharose, 1x PBS, 0,00012 M Calciumchlorid
Hoyers Mountant Medium	30 g Gummi arabicum in 50 ml ddH <sub>2</sub> O gelöst, ÜN drehend inkubiert, + 200 g Chloralhydrat + 16 ml Glycerin, 10 min 3000 x g
Hybridisierungslösung-A	50 % Formamid, 4x SSC, pH 5,0
Klebelösung	Paketklebebandstreifen + Heptan ÜN drehend inkubiert, 10 min zentrifugiert, 2/3 Klebelösung + 1/3 Heptan
LB - Agar	400 ml LB-Medium, 8 g Agar
LB - Medium	1 % NaCl, 1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt
Laemmli Laufpuffer, 10x	0,25 M Tris-Base, 1,92 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,4-8,9
Lower Tris, 4x (pH 8,8)	1,5 M Tris Base, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS, pH 8,8
PBS, 10x	1,3 M NaCl, 70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
PBT	1x PBS, 0,1 % Tween 20
Protein-Loading Dye, 3x	0,25 M Tris-HCL (ph 6,8), 15 % β-Mercaptoethanol, 30 % Glycerin, 7 % SDS, 0,3 % Bromphenol Blau
SSC 20x	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7
TAE 50x	2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA
TELT-Puffer	0,045 M Tris (pH 7,5-8,0), 0,06 M EDTA, 2,27 M LiCl, 0,36 % Triton-X, 5 µg/ml Lysozym, 10 µg/ml RNase
Transferpuffer, 10x	0,25 M Tris-Base, 1,9 M Glycin, 0,2 % SDS, 20 % Methanol
Upper Tris, 4x (ph 6,8)	0,5 M Tris Base, 8 mM EDTA, 2 ml 20 % SDS, pH 6,8

### Kits

TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
MEGAscript® T7	Ambion/Thermo Fisher Scientific
MinElute Gel Extraction/Reaction Cleanup	Qiagen
NucleoBond® Xtra Midi + Finalizer	Macherey-Nagel
SMARTer™ RACE cDNA Amplification	Clontech

### 2.2. Tierzucht

Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen bei 30°C auf Weizenmehl und Trockenhefe gehalten (Brown et al., 2009). Für Eiablagen wurde Instantmehl Typ 405, für Nachzuchten Weizen-Vollkornmehl mit 5 % Fumidil verwendet.

#### 2.2.1. Tierstämme

Für den Großteil der Versuche wurde mit einem transgenen Stamm gearbeitet, welcher Kern-lokalisiertes Grün-fluoreszierendes Protein (nGFP) exprimiert (Sarrazin et al., 2012). Dies war besonders für Lebendaufnahmen unter Fluoreszenz entscheidend. Für anfängliche RNAi-Versuche kam der Wildtyp-Stamm (WT) des San Bernardino Ökotyps (SB) zum Einsatz.

### 2.3. Genamplifikation

Zur Amplifikation von Kandidatengen aus cDNA wurden genspezifische Primer mittels NCBI's Primer Blast nach Standardkriterien designt, und in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Entstandene Banden wurden aus dem Gel geschnitten und die DNA mittels *MinElute Gel Extraction* Kit (Qiagen) eluiert. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend in einer 30-minütigen Reaktion bei Raumtemperatur in den pCR4 TOPO Vector (Invitrogen) kloniert. Das Plasmid wurde mittels Hitzeschock in kompetente *E. coli* Zellen (TOP 10, Invitrogen) eingebracht und auf mit Ampicillin versetzten LB-Selektionsplatten bei 37°C inkubiert. So konnten im Folgenden positive Klone identifiziert, gepickt und in LB-Medium für eine Mini-Präparation bei 37°C über Nacht vervielfältigt werden. Die anschließende Mini-Präparation diente dem Aufschluss der Zellen und der Aufreinigung der gewonnenen DNA. Die Validierung klonierter DNA erfolgte mittels Sequenzierung (LGC

Genomics). Zur Vervielfältigung der DNA in größerem Maßstab wurden die über die Sequenz bestätigten Klone in chemisch kompetente *E. coli* Zellen retransformiert und mittels Midi-Präparation (NucleoBond® Xtra Midi, Macherey-Nagel) aufgereinigt.

### 2.4. RACE - PCR

Für RACE-Reaktionen (Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde 3'- und 5'-RACE-Ready cDNA aus totaler RNA (SMARTer™ RACE cDNA Amplification, Clontech) den Herstellerangaben entsprechend synthetisiert. Es wurden genspezifische Primer mit einer Schmelztemperatur von mindestens 70°C generiert und zusammen mit entsprechenden Komponenten des Kits in einer Touchdown-PCR eingesetzt. Entstandene Fragmente wurden in den pCR4 TOPO Vector (Invitrogen) kloniert und sequenziert (LGC Genomics).

### 2.5. Genannotation und Analyse

Für die Analyse von Sequenzen und die Erstellung von Genmodellen wurden verschiedene Online-Tools verwendet. So wurde die Datenbank der *Tribolium*-Genom-Annotation Tribolium BLAST (<http://bioinf.uni-greifswald.de/blast/tribolium/blast.php>) verwendet um genspezifische Primer auf Off-targets zu testen und Informationen zu Genorganisation, RNA-Seq-Daten, sowie Proteinsequenzen zu erhalten. Das SMART Tool ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) wurde genutzt um Proteinsequenzen auf konservierte Domänen zu analysieren. Mit dem Programm Coding Potential Calculator (CPC) wurden die *Tc-flipflop* Gene auf ihr Proteinkodierungspotential getestet, der Protein Molecular Weight Calculator (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>) wurde eingesetzt, um die Größe von Flipflop1 und Flipflop2 für die Western-Blot Analysen zu ermitteln. Für die graphische Erstellung von Genmodellen und für Alignments von Sequenzen wurde das online frei verfügbare Tool Benchling genutzt (<https://benchling.com>).

### 2.6. RNA-Präparation

Die Synthese von dsRNA erfolgte in einer *in vitro* Transkription mittels T7-RNA Polymerase (MEGAscript® T7, Ambion®). Als Template diente ein Ethanol-gefälltes PCR-Produkt, welches aus dem jeweiligen Klon mit für den pCR4 TOPO Vektor-spezifischen Primern (Forward: GAA ATT AAT ACG ACT CAC AAT CGC GGA GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTC AG, Reverse: GAA ATT AAT ACG ACT CAC AAT CGC GGA GGG CGA ATT GAA TTT AGC GGC CGC) amplifiziert wurde. Diese Primer beinhalten eine Erkennungssequenz für die T7-Polymerase. Um RNA von vergleichbarer Qualität und



Konzentration verwenden zu können wurde für einige Experimente die Eupheria Biotech GmbH mit der Synthese von dsRNA - Fragmenten beauftragt.

### **2.7. Parentale RNAi**

Der spezifische Genknockdown auf post-transkriptioneller Ebene diente der funktionellen Untersuchung ausgewählter Entwicklungsgene. Dazu wurde dsRNA in adulte Weibchen injiziert und der Effekt in den Nachkommen analysiert. Für die Injektion wurden frisch geschlüpfte Weibchen mit dem Pronotum an doppelseitigem Klebeband befestigt und kurz auf Eis sediert. Die RNA wurde unter dem Binokular mittels feiner Glaskapillare in das Abdomen injiziert, bis zur vollständigen Streckung des Käfers. Die Tiere wurden zur Regeneration für einen Tag auf Weizenmehl gebracht; für Eiablagen nach Verheiratung wurde feineres, vorgeseiebtes Instantmehl Typ 405 verwendet. Die Eier wurden alle zwei Tage abgesiebt und im Brutschrank bis zur Kutikulabildung nachaltern gelassen. Die durch RNAi entstandenen Phänotypen der Nachkommen wurden durch Verwendung mindestens eines Nicht-überlappenden Fragments (NOF) verifiziert und somit Off-target Effekte ausgeschlossen. Die Konzentration der verwendeten dsRNA betrug in der Regel 1 µg/µl. Waren die Resultate des Knockdowns zu stark, sodass keine oder kaum auswertbare Kutikulas entstanden, wurde die Konzentration entsprechend verringert. Kam es primär zu keinen Effekten, wurde für Folgeexperimente dsRNA in einer Konzentration von 3 µg/µl verwendet.

### **2.8. Embryonale RNAi und Live-Imaging**

Um frühe maternale Effekte der RNAi zu vermeiden wurde der Knockdown einiger Gene direkt in Embryonen durchgeführt. Hierzu wurden Fünf-Stunden-Gelege mittels stark verdünnter Chlorbleiche vom Chorion befreit, auf einem Deckgläschen mit Heptankleber aufgereiht und mit 10 S Voltalef-Öl (VWR) überschichtet. Die Injektion erfolgte am inversen Stereomikroskop (Olympus IMT-2) mithilfe eines Mikromanipulators. Die injizierten Embryonen wurden anschließend bei 31°C bis zur Kutikulabildung inkubiert, oder direkt für Lebendaufnahmen (Live-Imaging) verwendet. Für Lebendaufnahmen wurden wildtypische, bzw. RNAi-behandelte nGFP-Embryonen wie oben beschrieben mit Wasser und einigen Tropfen Chlorbleiche gewaschen und dechorioniert. Anschließend wurden sie mit einem feinen Pinsel direkt auf einem Objektträger in 10 S Voltalef-Öl aufgereiht. Die Aufnahmen erfolgten am Stereomikroskop (AxioImager Z.1, Zeiss), mittels GFP-Fluoreszenz-Anregung unter Verwendung eines motorisierten Tisches (Zeiss) (siehe 2.16).

## 2.9. Kutikulapräparation

Die Nachkommen der parentalen RNAi-behandelten Tiere wurden im Larvenstadium präpariert. Dazu wurden sie mittels Chlorbleiche und Wasser vom Mehl befreit, in eine 1:1 Mischung aus Milchsäure und *Hoyer's Mountant Medium* (siehe 2.1, Lösungen) eingebettet und bei 60°C über Nacht mazeriert. Nach der Behandlung blieben nur kutikuläre Strukturen erhalten und konnten durch die Eigenfluoreszenz der Kutikula unter dem Fluoreszenzmikroskop (GFP-Filter) analysiert werden (siehe 2.16)

## 2.10. Fixierung von Embryonen

Für *in situ* Hybridisierungen wurden Ein- bis Zweitagesgelege des SB-WT-Stamms, als auch des nGFP-Stamms nach Standardprotokoll vorbereitet (Schinko et al., 2009; Shippy et al., 2009). Dazu wurden die Gelege abgesiebt, gewaschen, in Chlorbleiche (DanKlorix) dechorioniert und anschließend in Fixierungslösung (siehe 2.1, Lösungen) und Heptan für 25 - 40 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Fixierlösung wurde anschließend durch Methanol ersetzt. Die in Methanol und Heptan befindlichen Embryonen wurden durch Anwendung mechanischer Kräfte von der Vitellinmembran befreit. Die fixierten Embryonen wurden bis zur Verwendung in Methanol bei -20°C gelagert.

## 2.11. Whole mount *in situ* Hybridisierung

Zum Nachweis der mRNA durch die *in situ* Hybridisierung wurde nach Standardprotokoll verfahren (Schinko et al., 2009). Dazu wurden Digoxigenin-(DIG-) markierte RNA-Antisense-Sonden mittels *DIG RNA Labeling Kit* (Roche Applied Science) synthetisiert. Als Template dienten TA-klonierte Fragmente der nachzuweisenden Gene. Die Hybridisierung der Sonden mit den Embryonen erfolgte über Nacht bei 68°C in Hybridisierungslösung (siehe 2.1, Lösungen, pH 5,5). Als Antikörper gegen die DIG-markierten RNA-Antisense-Sonden wurde Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche) verwendet. Der Nachweis wurde mittels NBT/BCIP (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4chlor-3-indolylphosphat) (Roche Applied Science) in Färbepuffer (siehe 2.1, Lösungen) durchgeführt. Für alle Waschschrte wurde 1x PBS + 0,1 % Tween 20 verwendet. Nach dem Auswaschen des restlichen Färbepuffers über Nacht wurde eine fluoreszente Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342 (AppliChem), bzw. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Biotium) vorgenommen. Die Inkubation erfolgte für 30 min drehend bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde mit 1x PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und im letzten Schritt durch 30%iges, dann 60%iges

Glycerin ersetzt. Die gefärbten Embryonen wurden in 100%iges Glycerin auf einen Objektträger überführt und mittels feiner Glaskapillare vom Dotter befreit. Die Bilddokumentation erfolgte wie in 2.16 beschrieben.

### 2.12. Antikörpernachweis

Für den Nachweis von Proteinen im *whole mount* Embryo wurde nach bereits beschriebenen Methoden verfahren (Shippy et al., 2009), wenn nicht anders angegeben. Es wurden primäre Hasen-Antikörper gegen Flipflop1 (NH<sub>2</sub>-CPKTTKPKAK-CONH<sub>2</sub>) und Flipflop2 (NH<sub>2</sub>-CSKNTTEHKTK-CONH<sub>2</sub>) (Pineda Antikörper-Service), humane Phospho-p44/42 MAPK (#9101, Cell Signaling Technology), sowie *Drosophila* Cleaved Dcp-1 (#9578, Cell Signaling Technology) eingesetzt. Dcp-1 ist eine von sieben Caspasen in *Drosophila*. Caspasen sind spezieübergreifend die Hauptakteure der apoptotischen Signalgebung und hoch konserviert (Arya & White, 2015; Sarkissian et al., 2014; Xu et al., 2014). Sie werden inhibiert, wenn keine Apoptose stattfindet. Durch den Abbau des Inhibitors, initiiert durch pro-apoptische Proteine, werden diese Caspasen aktiviert und gespalten (engl. *cleaved*). Die aktivierten Caspasen induzieren daraufhin eine Kaskade, welche letztlich für die Entsorgung apoptotischer Zellen verantwortlich ist (Xu et al., 2014). Somit ist die gespaltene (*cleaved*), aktive Form der Dcp-1 Caspase ein positiver Indikator für programmierten Zelltod (Sarkissian et al., 2014).

Für die Nachweisreaktionen wurden die entsprechenden Antikörper in geeigneter Konzentration zu fixierten Embryonen gegeben (FF1, FF2, 1:10000; Cleaved Dcp-1, 1:1000) und über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde ein biotinylierter Anti-Rabbit Antikörper (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) in einer 1:200 Verdünnung verwendet. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte mittels Vectastain ABC-AP Kit (Vector Laboratories) in Färbepuffer (siehe 2.1, Lösungen). Alle Waschschrte wurden mit 1x PBS + Triton-X-100 durchgeführt. Des Weiteren wurden die Zellkerne durch 30 min Inkubation mit Hoechst, bzw. DAPI, für fluoreszentes Licht sichtbar gemacht. Zuletzt wurde der Puffer durch 30%iges, dann 60%iges Glycerin ersetzt. Die Embryonen wurden für die Bilddokumentation auf einen Objektträger mit 100%igem Glycerin überführt, mit einer feinen Glaskapillare vom Dotter befreit und mit der Ventralseite nach oben positioniert. Für Blastodermstadien und unpräparierte Embryonen wurden die Deckgläser mit Abstandshaltern versehen. Die Bilddokumentation erfolgte wie in 2.16 beschrieben.

### **2.13. Phalloidininfärbung (F-Actin Labeling)**

Phalloidin wurde aufgrund seiner Affinität zu F-Actin zur Sichtbarmachung des Cytoskeletts eingesetzt. Dazu wurden Embryonen in Methanol-freien Medien fixiert, in eine Petrischale geklebt und mit 1xPBS bedeckt. Mit einer abgebrochenen Glasnadel wurden die Embryonen vom Chorion befreit und in 1xPBS + 1 % Tween-20 bei 4°C aufbewahrt. Die Postfixierung in 5 % Methanol-freiem Formaldehyd + 1xPBS + 1 % Tween-20 erfolgte für 25 min bei Raumtemperatur. Nach mehreren Waschschritten wurde Fluorescein Phalloidin hinzugegeben (1:50, Molekular Probes<sup>TM</sup>, F432) und für ca. 3 h bei Raumtemperatur, beziehungsweise bei 4°C über Nacht, inkubiert.

### **2.14. Herstellung von Semidünnschnitten**

Um die innere Morphologie von RNAi Phänotypen im Detail darstellen zu können wurden Semidünnschnitte von Embryonen angefertigt. Hierzu wurden fixierte Embryonen (siehe 2.10) zunächst 15 min in einem Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) und nochmals 15 min in reinem Aceton gewaschen. Wurde zuvor eine *whole mount in situ* Hybridisierung durchgeführt, wurden die Embryonen zunächst durch eine Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden die Proben in einem Aceton-Araldit-Gemisch (1:1) über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Tiere in reines Araldit überführt, auf 60 °C erhitzt und in Formen gegeben, in welchen das Epoxidharz mindestens 17 h auspolymerisieren konnte. Die Blöcke wurden mit einem Diamantmesser in ca. 1 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger überführt. Die Färbung des Gewebes erfolgte mit 1 % Toluidinblau + 1 % Borax + 1 % Pyronin G (4:4:1 Mischung). Im letzten Schritt wurden die Proben mit Pertex (Medite GmbH) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 40°C. Die Bilddokumentation wurde wie in 2.16 beschrieben durchgeführt.

### **2.15. Western Blot**

#### **2.15.1. Proteinextraktherstellung**

Um das Vorhandensein spezifischer Proteine nachweisen zu können, wurden zunächst Proteinsuspensionen hergestellt. Hierzu wurden Eier verschiedener Entwicklungsstadien gesammelt und in Chlorbleiche und Wasser gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, mit Breaking Buffer (siehe 2.1, Lösungen) gewaschen und in 300 µl desselben Puffers auf Eis zu einer Suspension mechanisch aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert. 300 µl des

Überstandes wurden mit 150 µl 3x Protein-Loading Dye versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -20 °C.

### **2.15.2. Western Blot und Proteinnachweis**

Für den Blot wurde die zuvor hergestellte Suspension nochmals für 5 min bei 65 °C erhitzt und die Proteine im Gel für 10 min bei 100 V, anschließend bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Blotting erfolgte über Nacht bei 35 V und 4 °C. Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver + 1x PBS + 0,05 % Tween 20 geblockt und in 1x PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht wippend bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen wurde der sekundäre Antikörper (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) appliziert um 1 h bei Raumtemperatur zu inkubieren. Die Detektion der nachzuweisenden Antikörper erfolgte mittels Vectastain ABC-AP Kit (Vector Laboratories) und NBT/BCIP (Roche Applied Science).

### **2.16. Mikroskopie und Bildbearbeitung**

Für die Bilddokumentation und für Lebendaufnahmen wurde ein AxioImager Z.1 Mikroskop und AxioVision 4.8.1 Software (Zeiss), beziehungsweise Zen 2.3 blue edition Software verwendet. In anfänglichen Versuchen kam außerdem ein Axioplan 2 Mikroskop mit 2 MP Monochrome Camera (Diagnostic Instruments) und der Software RS Image Carbon, IPlab und ProgResC14 zum Einsatz. Um die Entwicklung mehrerer Embryonen gleichzeitig aufnehmen zu können (Live-Imaging, siehe 2.8), oder mehrere Aufnahmen eines Objektes in größerer Vergrößerung zu erstellen wurde ein motorisierter Tisch (Zeiss) verwendet. Um die Phototoxizität in Lebendaufnahmen möglichst gering zu halten, wurde pro Individuum minimal alle 1-2 min (frühe Blastodermentwicklung) bis maximal alle 5-10 min (über Nacht) eine Aufnahme durchgeführt. Zusätzlich kam ein automatisierter Shutter zum Einsatz, der eine dauerhafte Fluoreszenzbestrahlung zwischen den Aufnahmen verhinderte. Schwarz/Weiß-Aufnahmen von Kutikulapräparaten und Lebendaufnahmen wurden mit einer monochromen Kamera (AxioCam MRm, Zeiss) dokumentiert. Für Farbaufnahmen für den Nachweis von Genexpressionen in Embryonen wurde entsprechend eine Farbkamera (AxioCam MRc, Zeiss) verwendet. Um in der 20-fachen Vergrößerung komplette Individuen darstellen zu können wurde im *Multidimensional Acquisition* Modus mit der *MosaicX* Funktion (AxioVision), beziehungsweise der *Tiles* Funktion (Zen 2.3) gearbeitet. Zusätzlich

## Material und Methoden

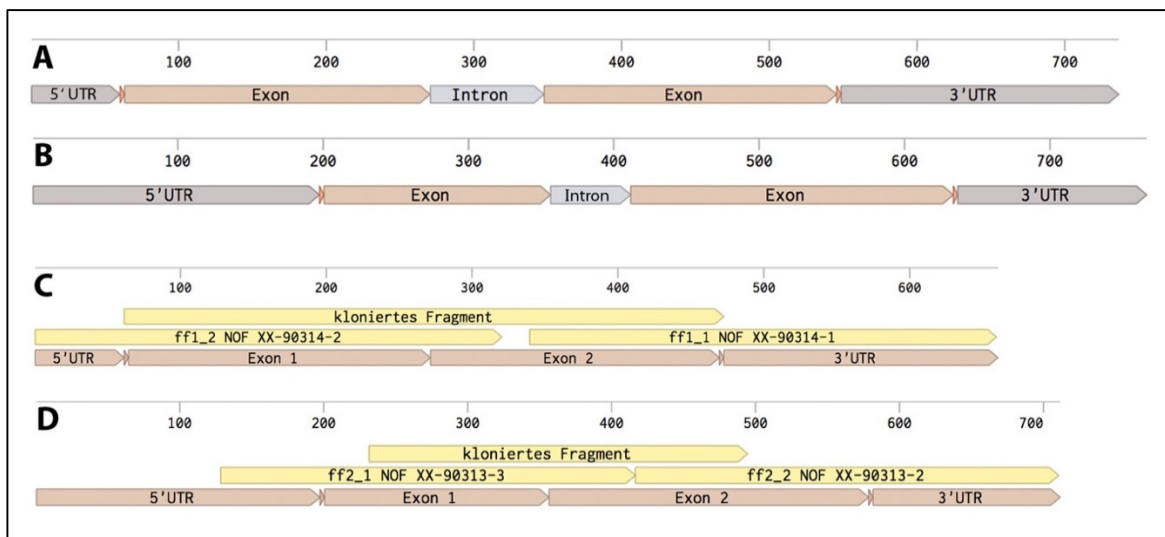
wurden von Kutikulapräparaten Z-Stapel angefertigt, um mehrere Ebenen gleichzeitig darzustellen. Dabei wurden maximal 14 Ebenen in einem Abstand von ein bis maximal 5  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Diese Bildstapel wurden anschließend mittels der Programmfunktion *Extended Focus* (AxioVision), oder *Extended Depth & Focus* (Zen) zu einem Bild zusammengefügt. Die finale Bildbearbeitung erfolgte mittels Adobe Photoshop CS5 und ImageJ.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Funktionelle Analyse von *Tc-flipflop1* und *Tc-flipflop2*

##### 3.1.1. Genmodell

Im Verlauf des iBeetle-Pre-Screens (Dönitz et al., 2014) wurde ein neuartiges Gen *TC032552* identifiziert, welches aufgrund seines auffälligen RNAi-Phänotyps eingestülpter Beine den Namen *Tc-flipflop* erhielt. In dieser Arbeit konnte über die Sequenzanalyse mittels BLAST ein zweites Gen *TC030881* identifiziert werden, welches aufgrund seiner Ähnlichkeit *Tc-flipflop2* genannt wurde (siehe **Abb. 1**). Dementsprechend erfolgte für *TC032552* eine Umbenennung in *Tc-flipflop1*. Sowohl *Tc-flipflop1* (660 bp, 136 AS) als auch *Tc-flipflop2* (711 bp, 127 AS) stellen zwei sehr kleine Gene dar, welche keine bekannten Domänen oder Homologien aufweisen. Beide bestehen aus jeweils zwei Exons und weisen im Sequenzvergleich mit annotierten Daten (<http://bioinf.uni-greifswald.de/blast/tribolium/blast.php>) und mehreren unabhängig klonierten Fragmenten einige variable Bereiche in der Basenabfolge auf.



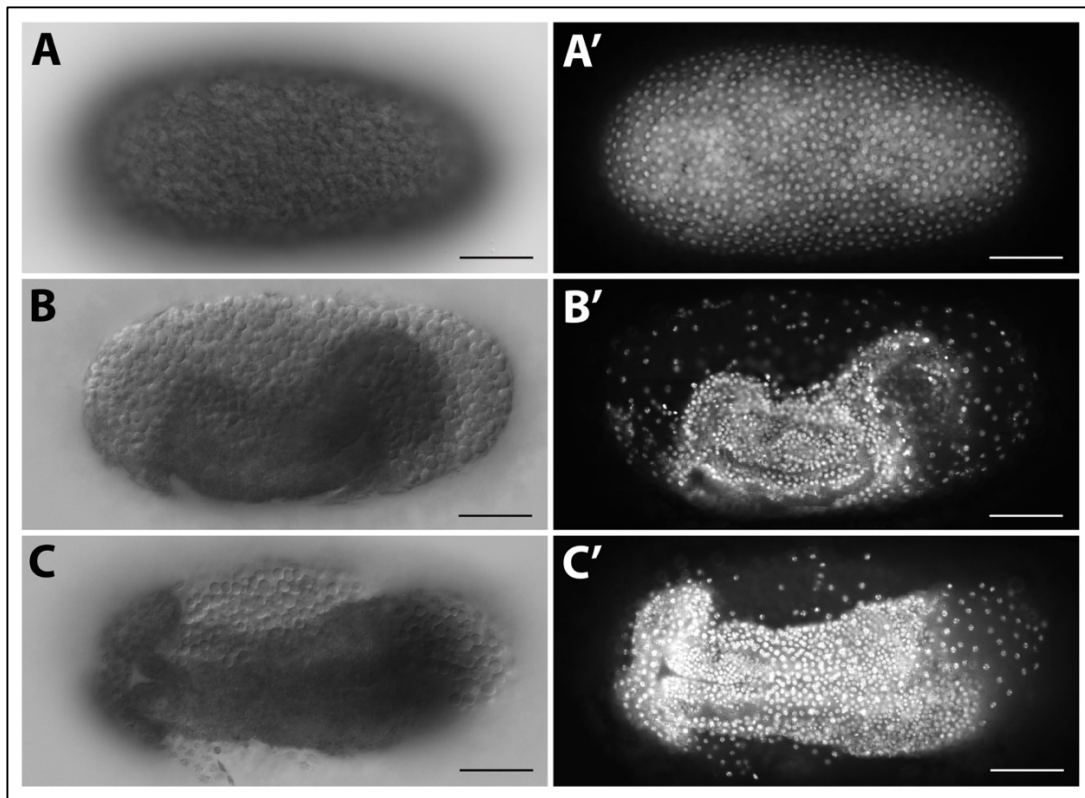
**Abb. 1** Genannotationsmodelle für *Tc-flipflop* mit Lage der verwendeten NOFs. (A) Genomische Annotation des *Tc-flipflop1* Gens (B) Genomische Annotation des *Tc-flipflop2* Gens (C, D) Knockdown von *Tc-ff1* (C) und *Tc-ff2* (D) mittels 3'-Fragment zeigte schwächere Defekte. Knockdown mittels 5'-Fragment resultierte hauptsächlich in leeren Eiern.

##### 3.1.2. Expressionsnachweis von *Tc-flipflop*

Der Expressionsnachweis im *whole-mount* Embryo erfolgte mittels RNA-Antisense-Sonden für die Gene *Tc-ff1* und *Tc-ff2*. Dabei konnte sowohl in den Blastodermstadien als auch in

## Ergebnisse

den Keimstreifen unterschiedlicher Entwicklungsstadien kein spezifisches Expressionsmuster festgestellt werden (siehe **Abb. 2**). *Tc-ff1* und *Tc-ff2* sind in jungen und älteren Stadien ubiquitär exprimiert. Das Signal der Expression in den Blastodermstadien ist allerdings wesentlich stärker als das der Keimstreifen. Um zu bestätigen, dass die mRNA nach dem Knockdown herabreguliert war, wurde die Expression von *Tc-ff* ebenfalls in *Tc-ff*<sup>RNAi</sup>-Embryonen analysiert. Dabei war ein deutlich schwächeres Signal zu erkennen, als in Wildtypembryonen und bestätigte so den Knockdown (Abb. nicht gezeigt).



**Abb. 2** Expressionsnachweis der mRNA von *Tc-ff* im WT. *Tc-ff1* und *Tc-ff2* sind in allen Stadien ubiquitär exprimiert. (A, A'), exemplarische Darstellung ubiquitärer Expression von *Tc-ff* im Blastoderm (B, B') Exemplarische Darstellung ubiquitärer Expression von *Tc-ff1* im jungen Embryo. (C, C') Exemplarische Darstellung ubiquitärer Expression von *Tc-ff2* im jungen Embryo. (A'-C') Fluoreszente Kernvisualisierung mittels DAPI. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

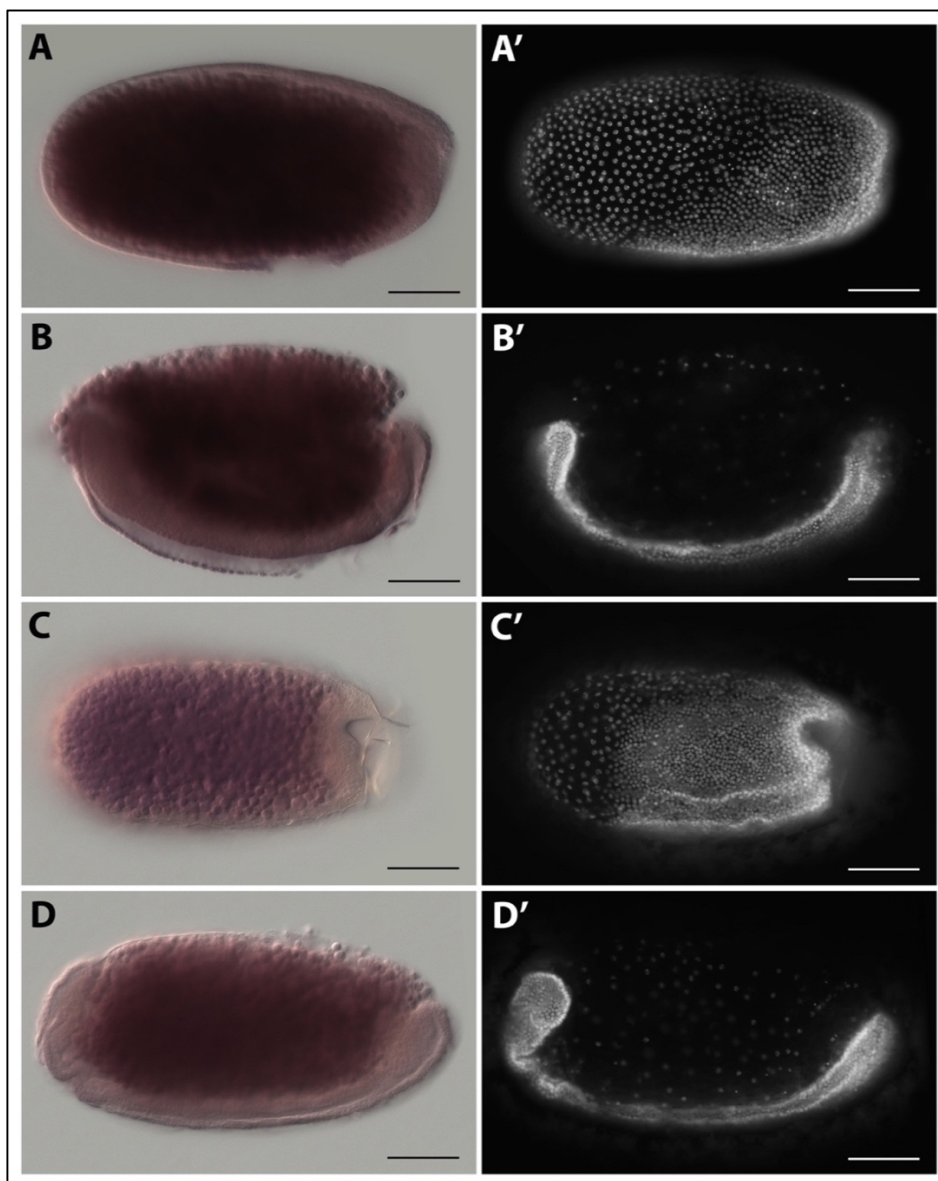
### 3.1.3. Proteinnachweis

Da es sich bei *Tc-flipflop1* und *Tc-flipflop2* um Gene mit unspezifischem Expressionsmuster handelt, wurden Antikörper gegen Peptide beider Gene generiert, um herauszufinden, ob diese für Proteine kodieren und wo sie im Embryo lokalisiert sind. Im *whole-mount* Antikörpernachweis wurden dabei starke unspezifische Signale im Dotter beobachtet, während Blastoderme und die Embryonen selbst überwiegend ungefärbt blieben (siehe **Abb. 3**). Mit-



## Ergebnisse

tels Western Blot konnte dann für beide Gene eine Proteinbande im entsprechenden Größenbereich des vorhergesagten Transkriptes (FF1, 14,47 kD; FF2, 13,63 kD) nachgewiesen werden (siehe **Abb. 4**). Zusätzlich wurden weitere hochmolekulare Banden detektiert, die nicht dem vorhergesagten Größenbereich der gesuchten Proteine entsprachen. Um das Vorhandensein der Flipflop-Proteine über die Sequenz identifizieren zu können wurde zusätzlich eine massenspektrometrische Proteinanalyse der Banden durchgeführt (Dr. Oliver Valerius, Universität Göttingen). Hier konnten jedoch nicht die entsprechenden Proteinsequenzen herausgelesen werden. Primär gab es Sequenzübereinstimmungen mit Fetten, Vitellin- (darunter Vitellogenin), und Cytoskelett- Proteinen.



**Abb. 3** Expressionsnachweis der *Tc-Flipflop* Proteine im Wildtyp. (A, B) Ubiquitäre Expression von *Tc-Flipflop1* exemplarisch dargestellt im Blastodermstadium (A) und im jungen Keimstreifen (B). (C, D) Ubiquitäre Expression von *Tc-Flipflop2* exemplarisch dargestellt im gastrulierenden Blastoderm (C) und im jungen Keimstreifen (D). (A'-D') Fluoreszente Kernvisualisierung mittels DAPI. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

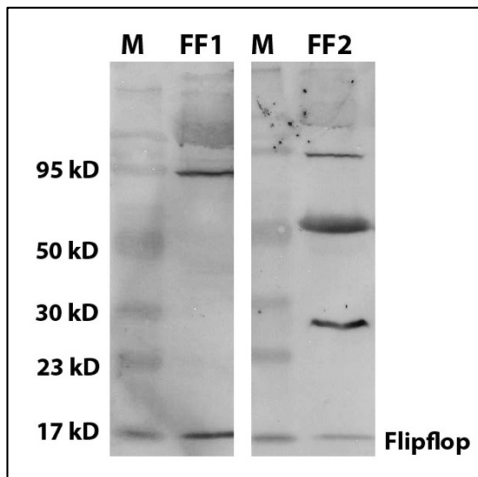


Abb. 4 Western Blot Analyse der *Tc-Flipflop* Proteine. M Marker; FF1 *Tc-Flipflop1*, theoretische Größe 14,47 kD; FF2 *Tc-Flipflop2*, theoretische Größe 13,63 kD.

### 3.1.4. Phänotypische Analyse nach *Tc-flipflop* RNA-Interferenz

#### 3.1.4.1. Phänotypische Ausprägungen larvaler Kutikulas

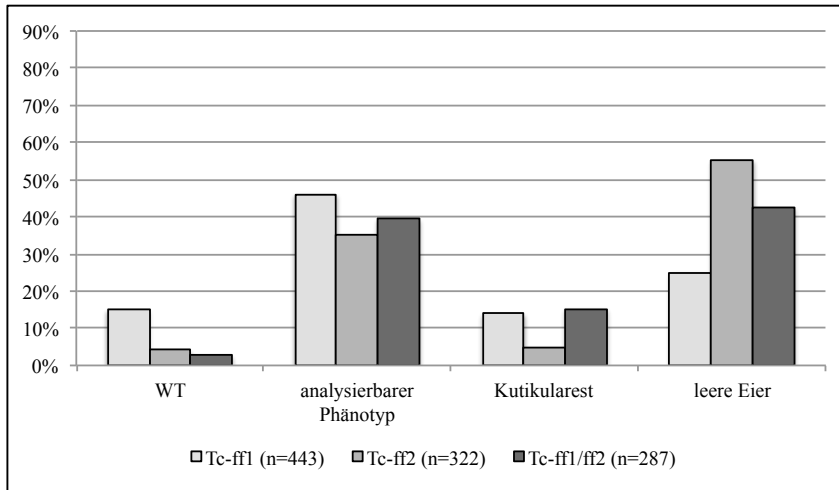
Die Gene *Tc-ff1* und *Tc-ff2* wurden mittels RNAi auf ihre Funktion hin untersucht. Die Analyse wurde sowohl auf larvaler Kutikulaebene, als auch an fixierten Embryonen und in der Lebendaufnahme durchgeführt. In Larven ließ sich, abhängig von der Schwere des Defektes, eine Varianz an Phänotypen für beide Gene feststellen. Die hier vorgenommene detaillierte statistische Auswertung bezieht sich dabei auf die für das jeweilige Gen nicht-überlappenden Fragmente (NOF) *ff1\_1* (XX-90314-1) und *ff2\_2* (XX-90313-2), welche beide jeweils im 3'-Bereich der Gene lagen. Den stärksten Phänotyp repräsentierten dabei die sogenannten leeren Eier. In diesen Fällen wurde innerhalb der Vitellinhülle keine Kutikula gebildet, das heißt, die Weiterentwicklung des Embryos war bereits vor dem Larvenstadium gestört. Während leere Eier bei *Tc-ff1* nach RNAi zu 25 % auftraten, waren es für *Tc-ff2* 55 %, in der *Tc-ff1/Tc-ff2*-Doppel RNAi 40 % (siehe **Abb. 5**). Der für *Tc-flipflop* charakteristische Phänotyp invertierter Körperanhänge kam in beiden Knockdowns am häufigsten vor. Dabei waren sowohl Beine, Kopfanhänge, als auch Urogomphi in unterschiedlichen Kombinationen betroffen. Ein Körperanhang galt als invertiert, wenn er an der Kutikula-Außenseite vollständig fehlte und stattdessen im Inneren der larvalen Kutikula zu erkennen war. Auch im eingestülpten Zustand behält jede Struktur eine veränderte aber charakteristische Morphologie bei. Durch die umgestülpte Kutikula wird diese unregelmäßig, länglich und dünner. Die distalen Segmente sind im Falle von invertierten Beinen (prätersale Klaue, siehe **Abb. 11A**)

und Antennen (Flagellum, siehe **Abb. 11B**) häufig noch als solche identifizierbar. Von allen Extremitäten waren die Mandibeln, sowohl in der *Tc-ffl*-Einzel- (69 %), als auch in der Doppel-RNAi (70 %) am häufigsten betroffen (siehe **Abb. 6**, **Abb. 8** und **Abb. 10**). Sehr selten wurden in den Einzel- (*Tc-ffl*, 3 %, *Tc-ff2*, 16 %) und Doppel-RNAi's (9 %) invertierte Maxillen beobachtet. Invertierte Beine waren in der *Tc-ffl* RNAi zu 40 %, bei *Tc-ff2* zu 67 % und im Doppel zu 43 % beobachtet worden. Am häufigsten war dabei nur ein, in den seltensten Fällen, bei stärker betroffenen Kutikulas, alle Beine invertiert. Neben Invertierungen von Extremitätenhomologen zeigten *Tc-ff* Knockdown Larven weitere Defekte. Hierzu gehörten zum einen invertierte Urogomphi, bzw. Abdomen (*Tc-ffl*, 16 %; *Tc-ff2*, 19 %, Doppel, 19 %, siehe **Abb. 8F**, **Abb. 9E** und **Abb. 10**), als auch Defekte im Rückenschluss (*Tc-ffl*, 31 %; *Tc-ff2*, 35 %, Doppel, 45 %, **Abb. 10**). Zusammengenommen werden alle beobachteten *ffl*- und *ff2*-RNAi Phänotypen, deren Ausprägung identisch ist, als "*ff*-Syndrom" bezeichnet und im weiteren Text häufig zu *Tc-ff* zusammengefasst.

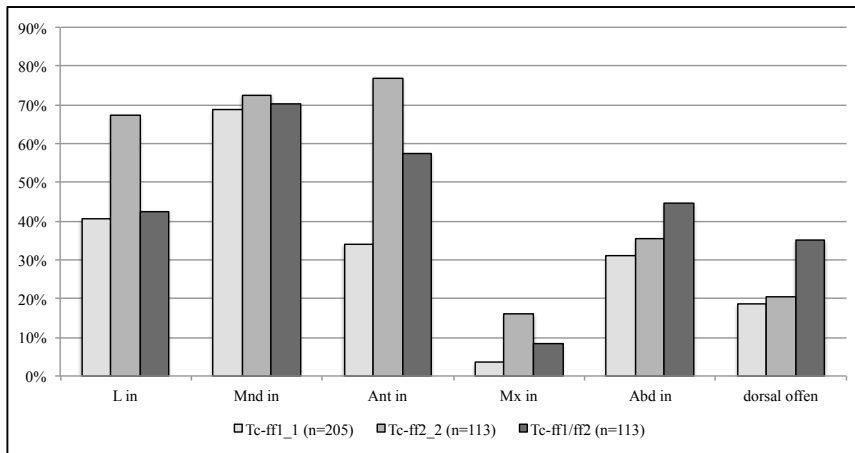
Um den ursprünglich beobachteten Phänotyp zu verifizieren und um off-target Effekte auszuschließen, wurden RNAi-Versuche mit nicht-überlappenden Fragmenten für *Tc-ffl* (*ffl\_2*, XX-90314-2) und *Tc-ff2* (*ff2\_1*, XX-90313-3) durchgeführt. Diese bestätigten zwar die Genfunktion hinsichtlich des Phänotyps, resultierten jedoch darüber hinaus in stärkeren Defekten. So wurde bei über 90 % der gelegten Eier keine Kutikulabildung beobachtet, was dem Phänotyp leerer Eier entspricht. In beiden Fällen handelte es sich dabei um die Fragmente der 5' Region (siehe **Abb. 1**).

Zu nochmals unterschiedlichen Ergebnissen in der Statistik kam es nach dem Knockdown bei Verwendung des SB-WT Stamms mittels eigens klonierter Fragmente (siehe **Abb. 1**). Hierbei war es nicht möglich, eine phänotypische Auswertung für die RNAi Experimente von *Tc-ff2* anzufertigen, da keines der Individuen eine Kutikula ausbildete, was in leeren Eiern resultierte. Im Falle der *Tc-ffl*-RNAi bestand hingegen der größte Anteil in der Analyse aus Kutikulas mit wildtypischem Habitus (37,7 %). Mit 27,9 % war ein nach außen gestülptes Proctodaeum (Hinterdarm) der häufigste Phänotyp betroffener Individuen (siehe **Abb. 7**). Dies wurde im Vergleich dazu nur in 8,8 % der Fälle nach Verwendung der von einer Firma (Eupheria) synthetisierten dsRNA im nGFP Stamm für *Tc-ff2*, bzw. zu 3,9 % für *Tc-ffl* identifiziert.

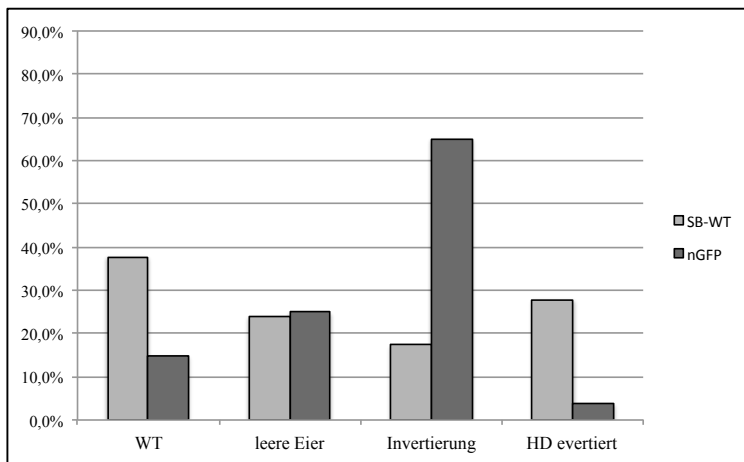
## Ergebnisse



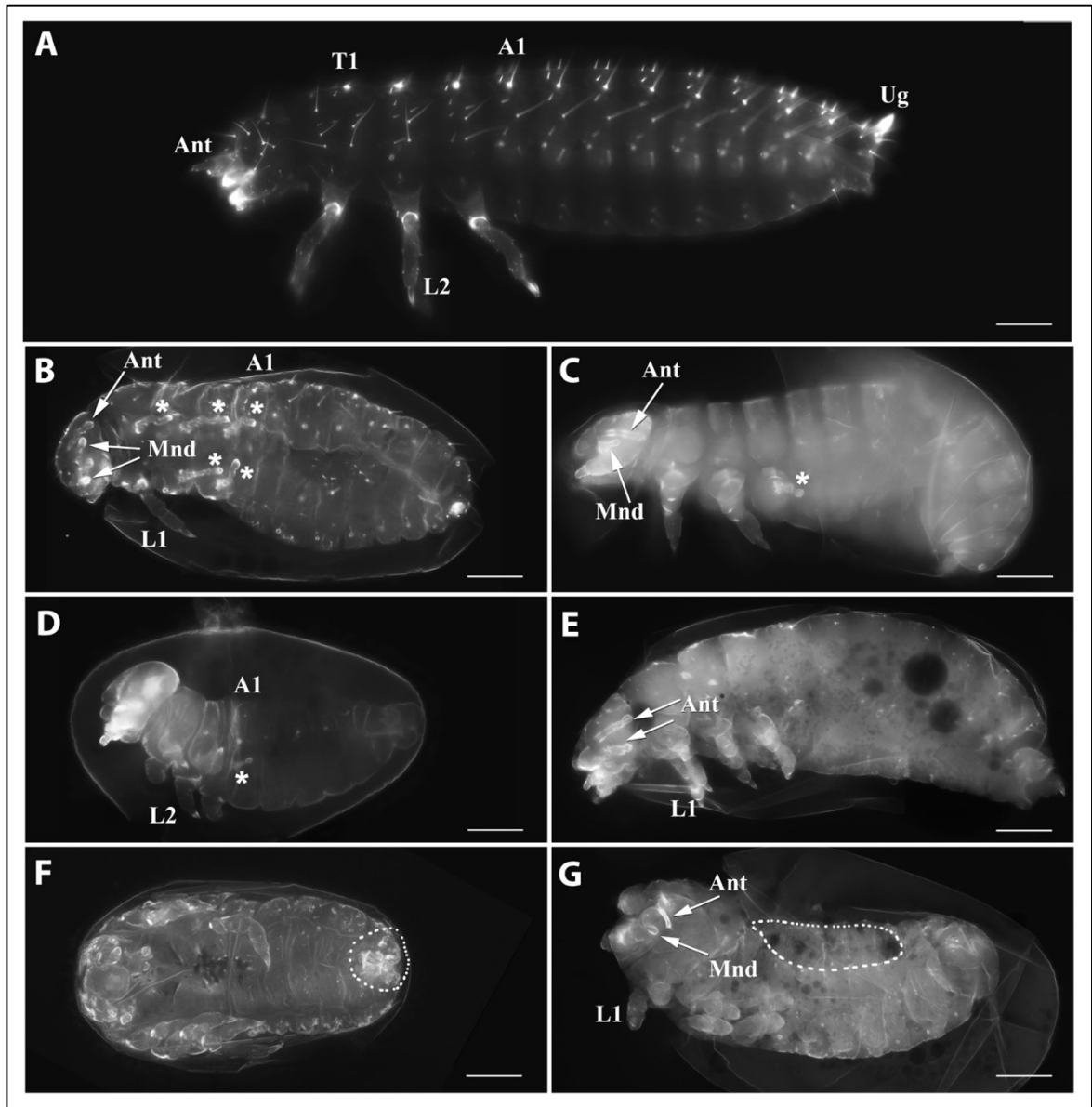
**Abb. 5 Statistische Verteilung larvaler Kutikulaphänotypen nach RNAi.** *Tc-ff1* Einzel-Knockdown; *Tc-ff2* Einzel-Knockdown; *Tc-ff1/ff2*-Doppel-Knockdown. Larven mit wildtypischem Habitus (WT), analysierte Kutikulas beinhalten alle aufgetretenen Phänotypen; phänotypisch nicht-analyisierbare Kutikulareste; leere Eier ohne Kutikula.



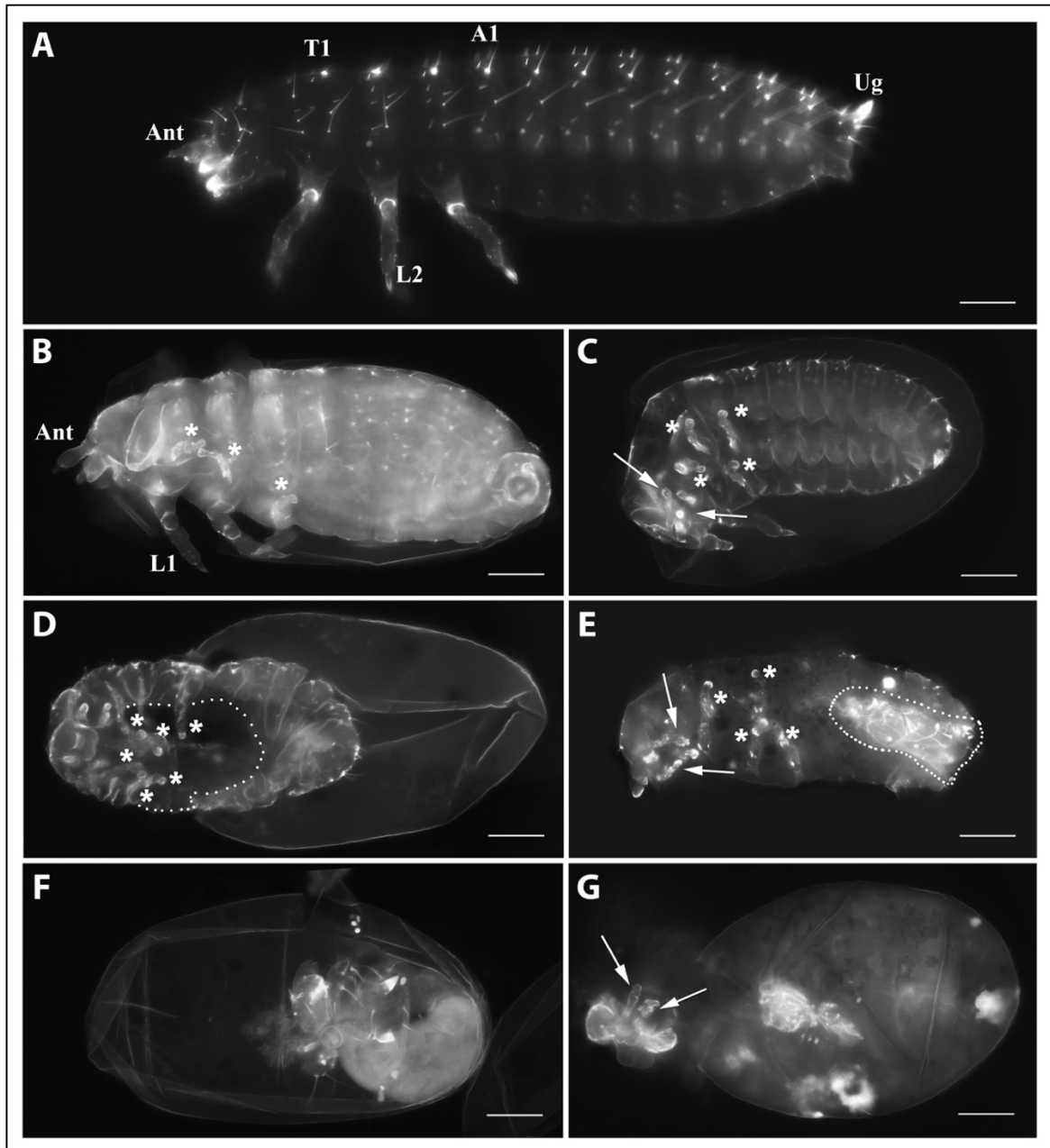
**Abb. 6 Analyse larvaler Kutikulaphänotypen nach RNAi.** *Tc-ff1* Einzel-Knockdown; *Tc-ff2* Einzel-Knockdown; *Tc-ff1/ff2*-Doppel-Knockdown. Abd Abdomen; Ant Antenne; L Bein; Mnd Mandibel; Mx Maxille.



**Abb. 7 Stammspezifischer Vergleich larvaler Phänotypen nach *Tc-ff1* RNAi.** SB-WT San Bernardino Wildtypstamm; nGFP transgener Stamm mit Kernfluoreszenz.

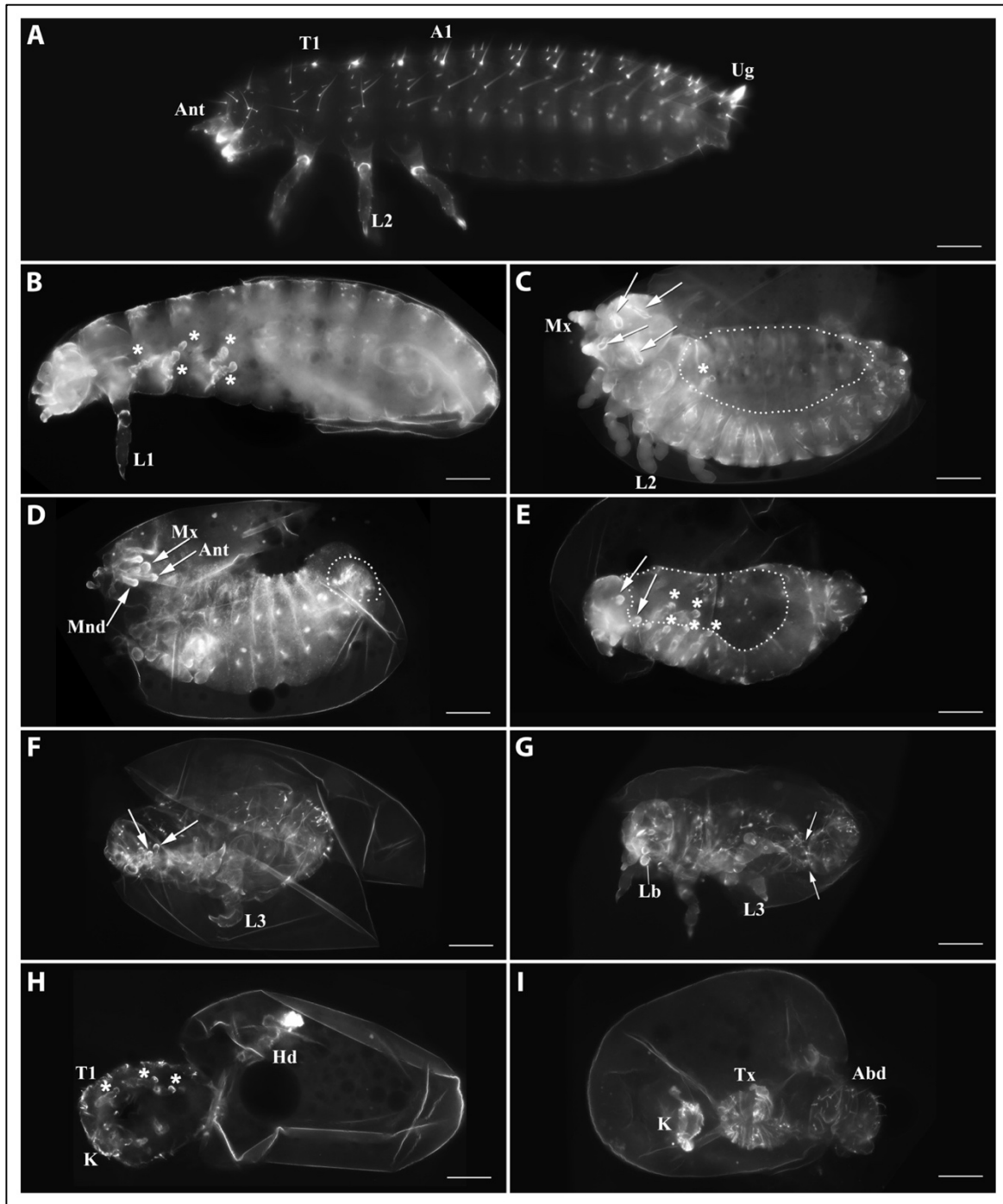


**Abb. 8 Phänotypische Varianzen der larvalen Kutikula nach *Tc-flipflop1* RNAi.** (A) Wildtyp. (B). Invertierte Beine (Sternchen) und Kopfanhänge (Pfeile). (C) Invertierte Mandibel und Antenne, leicht deformierte Beine, ein Bein invertiert. (D) starker Phänotyp, kurze Beine, teilweise invertierte Anhänge, deformiertes Abdomen. (E) Invertierte Antennen, kurze deformierte Beine, eingeschnürtes Abdomen. (F) Ventralansicht. Teilweise invertierte Kopfanhänge, invertiertes Abdomen (gestrichelte Linie). (G) Invertierte Kopfanhänge, kurze deformierte Beine ohne Krallen und Rückenschlussdefekt (gestrichelte Linie). A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L1/L2 Bein des ersten/zweiten Thoraxsegments; Mnd Mandibel; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

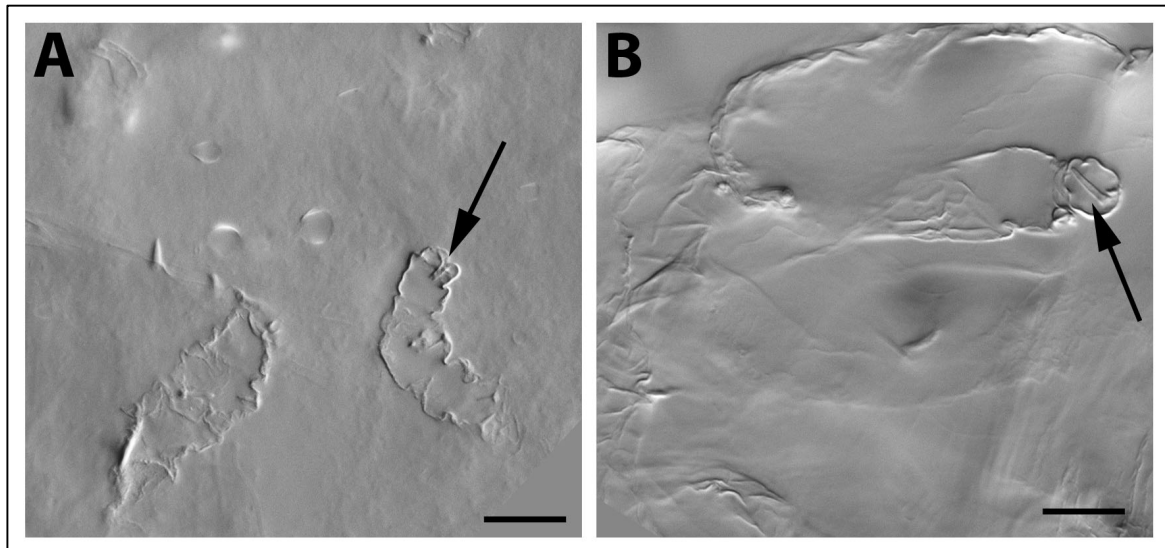


**Abb. 9** Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach *Tc-flipflop2* RNAi. (A) Wildtyp. (B) invertierte Beine (Sternchen). (C) Invertierte Kopfanhänge (Pfeile) und Beine (Sternchen). (D) Rückenschlussdefekt (gestrichelte Linie), invertierte Beine (Sternchen). (E) Invertierte Kopfanhänge (Pfeile) und Beine (Sternchen), invertiertes Abdomen (gestrichelte Linie). (F) Kutikularest. (G) starker Phänotyp; Kopf mit invertierten Anhängen (Pfeile) und Kutikularest. A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L1/L2 Bein des ersten/zweiten Thoraxsegments; Mnd Mandibel; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.





**Abb. 10** Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach *Tc-ff1-ff2* RNAi. (A) Wildtyp. (B) Invertierte Beine (Sternchen). (C) Invertierte Kopfanhänge (Pfeile), ein invertiertes Bein (Sternchen). (D) Invertierte Kopfanhänge (Pfeile), invertiertes Abdomen (gestrichelte Linie). (E) Komplett invertierte Beine (Sternchen), invertierte Kopfanhänge (Pfeile), Rückenschlussdefekt (gestrichelte Linie). (F) Stark deformierte Beine, invertierte Kopfanhänge (Pfeile). (G) Deformierte Beine, eingeschnürtes Abdomen (Pfeile). (H) Starker Phänotyp in Ventralansicht. Invertierte Anhänge, evertierter Hinterdarm (Hd). (I) Kutikularest. Invertierungen am Kopf. A1 Abdominalsegment 1; Abd Abdomen; Ant Antenne; L1-3 Bein des 1.-3. Thoraxsegments; Hd Hinterdarm; K Kopf; Mnd Mandibel; Mx Maxille; Tx Thorax; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.



**Abb. 11** Detailaufnahmen von larvalen Kutikulas nach *Tc-flippflop* RNAi. (A) Invertiertes Bein mit nach 'außen' orientierter prätersaler Klaue (Pfeil). (B) Invertierte Antenne mit nach 'außen' orientiertem distalem Antennensegment (Pfeil). Maßstab: 20  $\mu$ m

### 3.1.4.2. Embryonale Morphologie

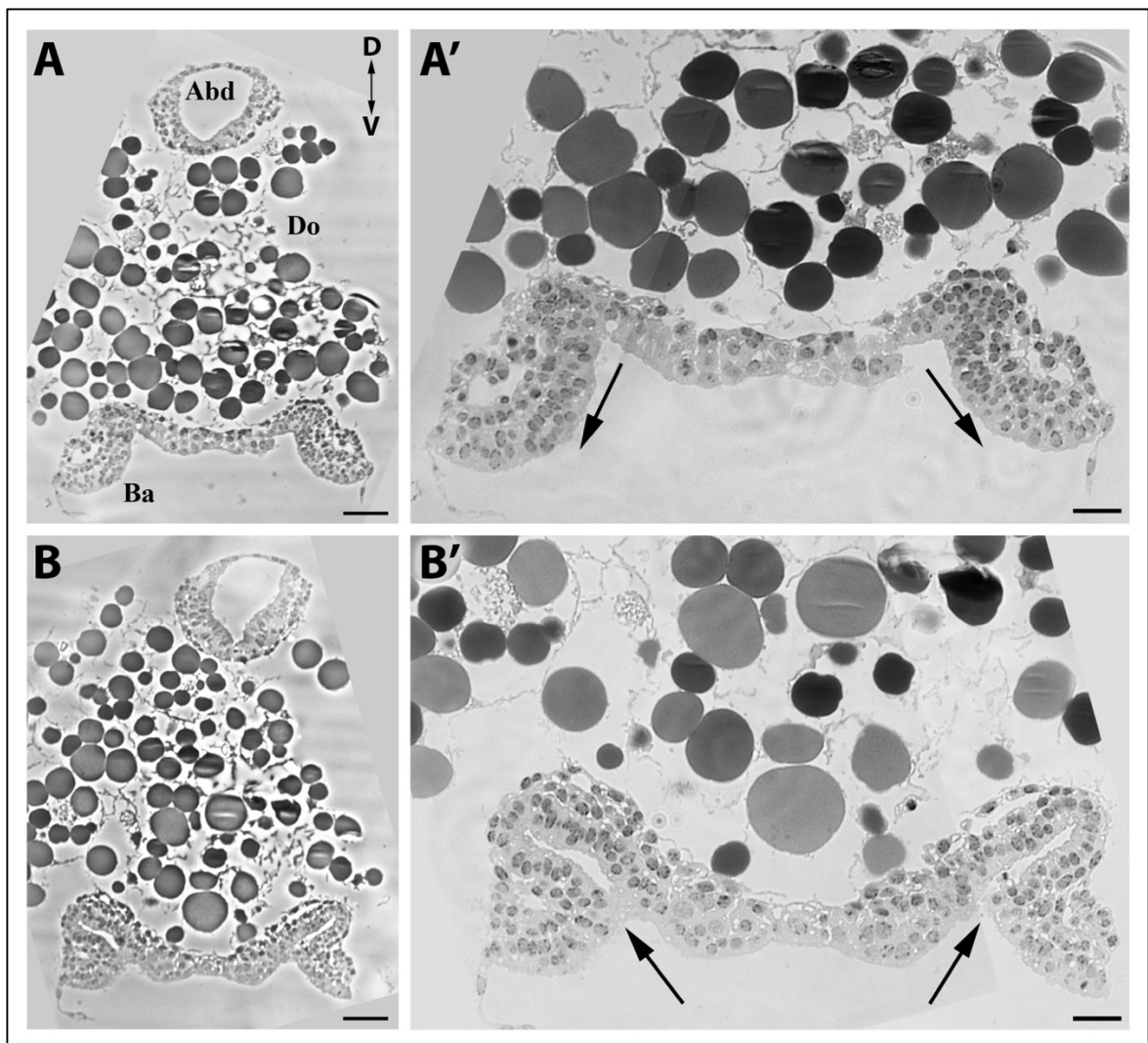
Um zu erkennen, wann in der Embryonalentwicklung die Inversion der Extremitäten beginnt, wurden fixierte RNAi-Embryonen untersucht. In diesen konnte eine veränderte Polarität des Beinanlagenwachstums bereits in frühen Keimstreifen, zu Beginn der Beinknospenbildung, nachgewiesen werden (siehe **Abb. 24G**). Ein weiterer Effekt war schon in jungen gastrulierenden Embryonen vor Beginn der Achsenverlängerung zu sehen und betrifft die Morphologie und das Verhalten der extraembryonalen Membranen. Hier war zum Teil ein stark vergrößertes Serosafenster erkennbar (siehe **Abb. 24B**). Des Weiteren konnte in fixierten Embryonen ein Defekt in der Direktionalität extraembryonaler Membranen festgestellt werden. Dies äußerte sich vermutlich in einer Faltung des Amnions nach Dorsal, statt sich ventral über den Embryo zu legen (siehe **Abb. 21** und **Abb. 24D**).

Wie früh bereits Defekte in der Embryonalentwicklung auftraten, konnte in Lebendaufnahmen (Live-Imaging) nachvollzogen werden. Bereits nach dem Blastodermstadium konnten directionale Unregelmäßigkeiten in der Migration von Serosa- und angrenzendem Amnionzellen festgestellt werden (siehe **Abb. 14**). Das Gewebe wurde löchrig und die Direktionalität der Zellen verlief ungeordnet und willkürlich. Die Entwicklung solcher Embryonen war entsprechend früh gestört und brachte keinen Keimstreifen hervor.

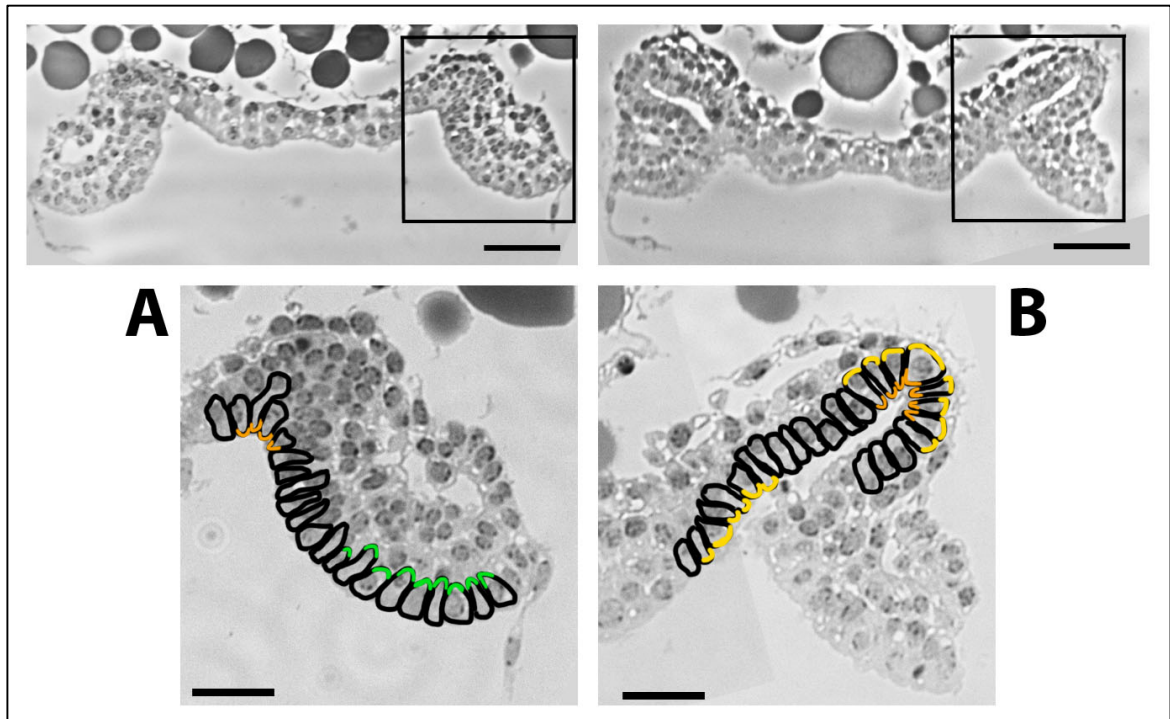


## Ergebnisse

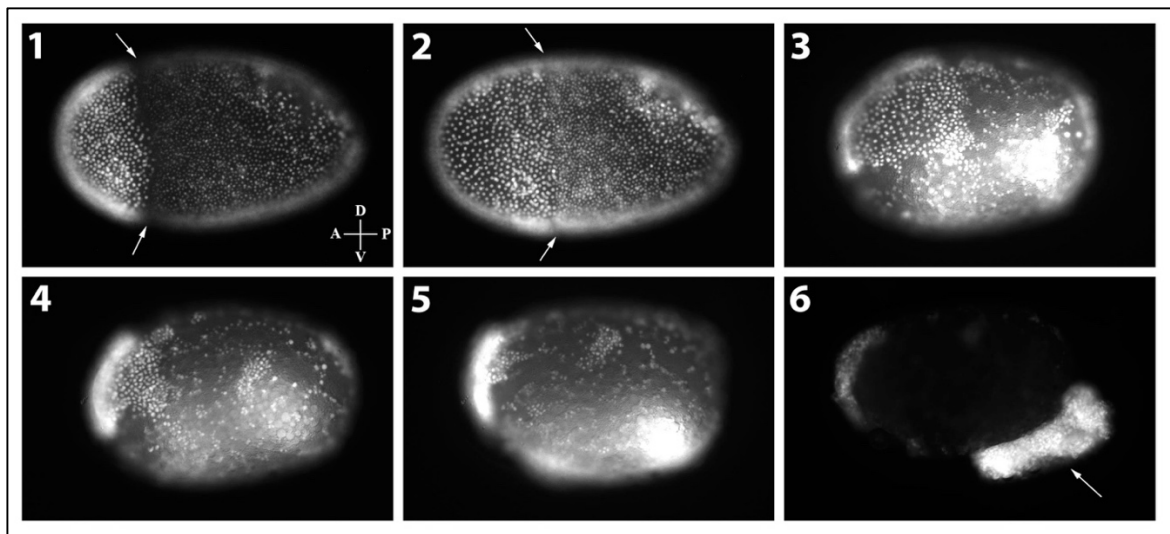
Ein detaillierteres Bild der Gewebemorphologie von *Tc-flipflop*-RNAi-Embryonen sollte mittels Semidünnschnitten (ca. 1  $\mu\text{m}$ ) dargestellt werden. Im Vergleich zu normal evaginierten Beinanlagen war deutlich zu erkennen, dass die Wachstumspolarität der Anlagen durch den Knockdown, statt nach ventral, in Richtung des dorsal gelegenen Dotters verlagert war (Vgl. **Abb. 12A** und **B**). Die ektodermalen Zellen wiesen dabei apikale Konstriktion auf, während diese in evaginierten Anlagen basal verengt waren (siehe **Abb. 13**). Auf diese Weise war das Mesoderm an der somit entstandenen "Außenseite" lokalisiert und nicht mehr innenliegend, wie in evaginiertem Gewebe.



**Abb. 12** Semidünnschnitt der Saggitalebene eines Embryos nach *Tc-ffl* RNAi. (**A, A'**) Evertierte Beinanlagen (Ba) in der Übersicht der Schnittebene (**A**) und in der Detailaufnahme (**A'**). (**B, B'**) Invertierte Beinanlagen (Pfeil) in der Übersicht (**B**) und in der Detailaufnahme (**B'**). Abd Hinterdarmanlage des Abdomens; Ba Beinanlage; D Dotter. (**A, B**) Maßstab 20  $\mu\text{m}$ . (**A', B'**) Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 13 Apikale vs. basale Konstriktion in evaginiertem und invaginiertem Gewebe.** (A) Evaginierte Beisanlage zeigt apikal verengte Zellen an der Basis der Evagination (orange) und basal verengte Zellen an der distalen Spitze. (B) Apikale Konstriktion findet an der Basis der Beisanlage nicht statt (gelb). Statt basaler Konstriktion an der eigentlich distalen Spitze der Beisanlage (gelb) sind die Zellen apikal verengt (orange).



**Abb. 14 Ausschnitte aus Live-Imaging Aufnahmen nach *Tc-flipflop* RNAi.** (1-6) Unregelmäßige Zellanordnung und -wanderung extraembryonaler Gewebe führt zu frühen Defekten in der Embryogenese. (1; 2) Pfeile zeigen die Grenze zwischen Amnion und Serosa. (6) Embryonales Gewebe akkumuliert außerhalb des Eis.

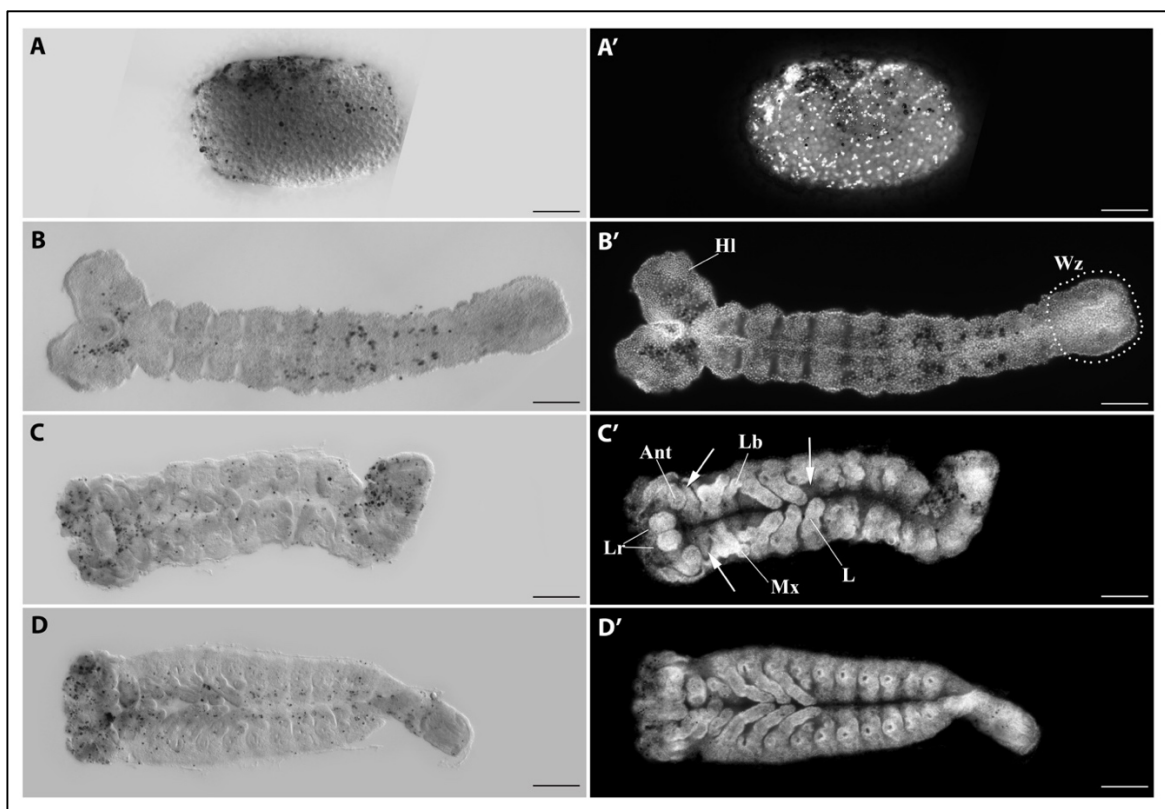
### 3.1.5. Programmierter Zelltod (Apoptose)

Bei verschiedenen formgebenden Prozessen epithelialer Morphogenese, wie z.B. der Formung von Extremitäten, kann Apoptose entscheidend zu Zellformveränderungen beitragen (Monier et al., 2015; Saunders & Gasseling, 1962). Anzeichen auf vermehrt stattfindenden

## Ergebnisse

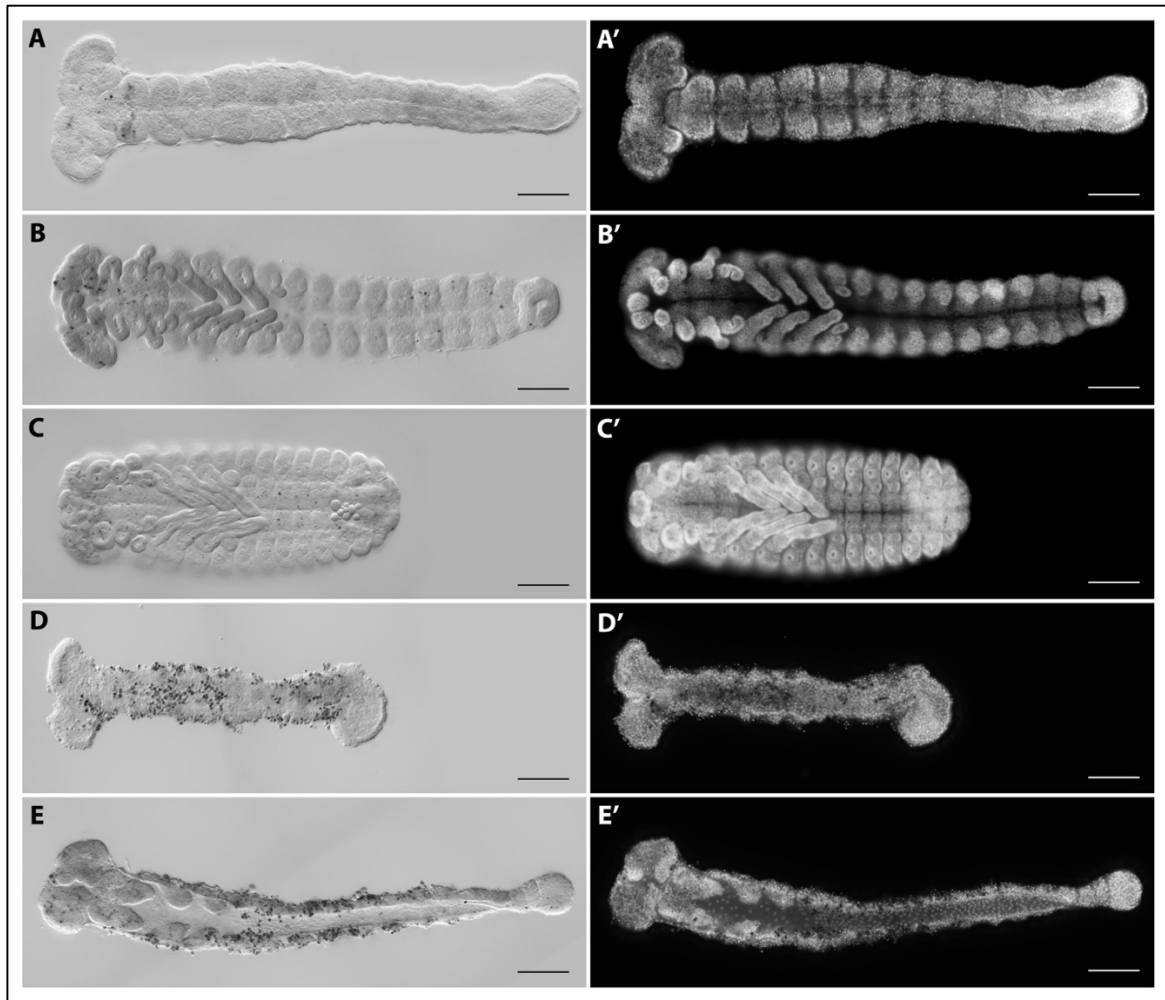
Zelltod nach *Tc-ff* Knockdown lieferte der hohe Anteil an Embryonen, deren Entwicklung noch vor Bildung einer larvalen Kutikula so stark gestört war, dass er in leeren Eiern resultierte.

Der *whole-mount* Antikörpernachweis zeigte in einigen RNAi-Embryonen ein minimal erhöhtes Vorhandensein der Cleaved Caspase Dcp-1 im Vergleich zu unbehandelten Wildtypembryonen (Vgl. **Abb. 15** und **Abb. 16**). Die Lokalisation der apoptotischen Signale war dabei jedoch eher stochastisch und deckte sich nicht mit den Regionen morphologisch sichtbarer Defekte im Embryo (siehe **Abb. 15**). Lediglich in einigen frühen Blastodermstadien konnte ein erhöhtes Maß an Apoptose festgestellt werden (siehe **Abb. 15A**). In der Kernfluoreszenz-Aufnahme war in diesem Fall eine stark defekte Anordnung der Zellen zu sehen. Dies ist vergleichbar mit Lebendaufnahmen junger Embryonen, deren Embryogenese frühzeitig endet und somit keinen Keimstreifen hervorbringt.



**Abb. 15** Expressionsnachweis von Dcp-1 nach *Tc-flipflop* RNAi. (A) Leicht erhöhtes Apoptoselevel im frühen Blastodermstadium. (A') Unregelmäßige Anordnung der Zellen. (B-D) Dcp1-positive Signale akkumulieren in medianen Bereichen der Kopfregion und entlang des Keimstreifens. (C') Invertierte Mandibelanlagen und ein invertiertes Bein des 3ten Beinpaars (Pfeile). (A'-D') Fluoreszente Kernvisualisierung mittels DAPI. Ant Antenne; Hl Kopflappen; L Beinanlage; Lb Labium-Anlage; Lr Labrum-Anlage; Mx Maxillen-Anlage; Wz Wachstumszone. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.





**Abb. 16** Expressionsnachweis von Dcp-1 in Wildtypembryonen. (A-C) Unbehandelte Wildtypen. (D-E) Erhöhtes Dcp1-positives Signal in UV-behandelten Wildtypen. (A'-E') Fluoreszente Kernvisualisierung mittels DAPI. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

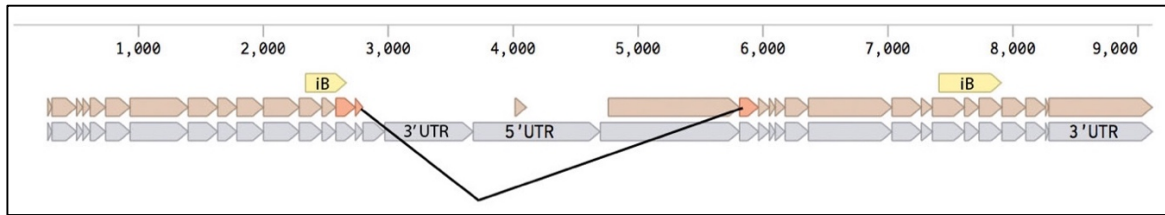
### 3.2. Funktionelle Analyse von *Tc-RhoGEF2*

#### 3.2.1. Genmodell

In der Enhancer-trap Insertions-Linie KT221, die dem Gen *Tc-RhoGEF2* zugeordnet werden konnte, wurde erstmals ein mit *Tc-flipflop* vergleichbares Invertierungssyndrom beobachtet (Dr. Anke Beermann, persönliche Mitteilung). *Tc-RhoGEF2* galt daher als ein weiterer Kandidat für die Festlegung von Direktionalität sich entwickelnder Strukturen im *Tribolium* Embryo. Als hoch konserviertes Kandidatengen wurde *Tc-RhoGEF2* in dieser Arbeit daher intensiv funktionell analysiert.

Die ursprünglich veröffentlichte Annotation deutete auf zwei nebeneinanderliegende *RhoGEF2*-Gene hin. Hinsichtlich der für RhoGEFs charakteristischen Domänen bestand jedoch

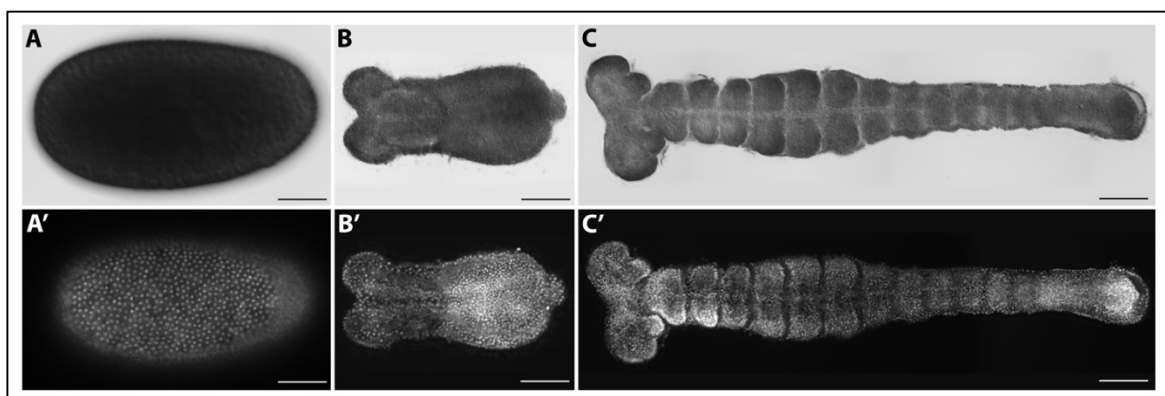
die Vermutung, dass die Genmodelle *TC003070* und *TC032343* zu einem einzelnen zusammengefasst werden müssen (siehe **Abb. 39**). Auch die übereinstimmenden Knockdown-Phänotypen beider Bereiche wiesen darauf hin. Tatsächlich konnten Exons beider Genmodelle bei einer Standard-PCR aus cDNA in einem Amplifikat nachgewiesen werden (siehe **Abb. 17**) und somit der Nachweis für das Vorhandensein eines zusammenhängenden Transkriptes erbracht werden.



**Abb. 17** Genannotationsmodell für *Tc-RhoGEF2*. Alte Annotation der zwei Gene *TC032343* und *TC003070* (Richards et al.). Neue Annotation eines *RhoGEF2* Gens (beige). PCR-Amplifikat als Nachweis des einzelnen Gens (orange). Dazwischenliegende annotierte Exons waren nicht im Amplifikat enthalten.

### 3.2.2. Expressionsnachweis von *Tc-RhoGEF2*

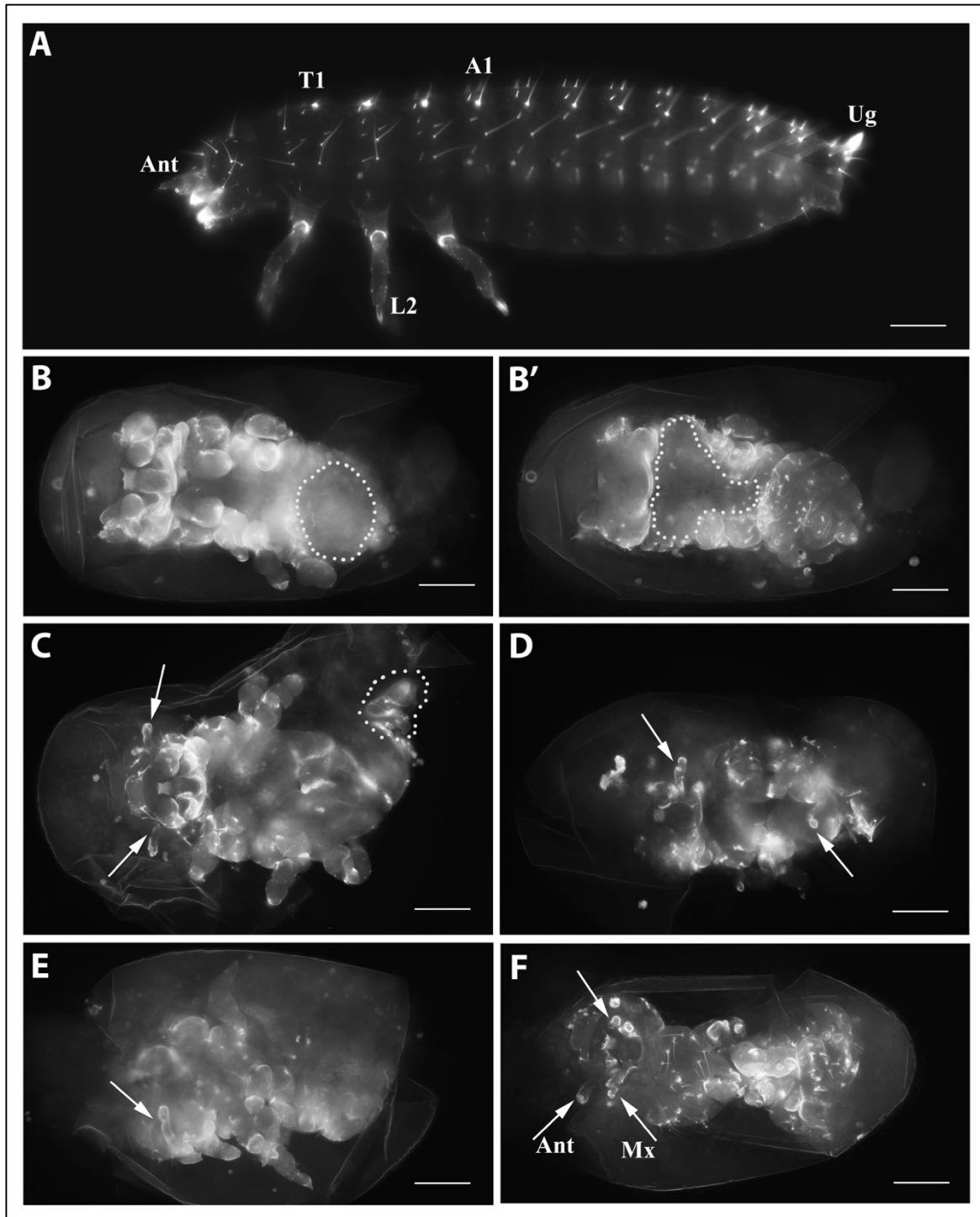
RhoGEF2 ist in vielen Geweben an unterschiedlichen Prozessen der embryonalen Morphogenese beteiligt. Die *in situ* Hybridisierung mit RNA-Antisense-Sonden gegen *Tc-RhoGEF2* ergaben ubiquitäre Signale sowohl im gesamten Embryonalgewebe aller Stadien, als auch in den Blastoderm-Stadien (siehe **Abb. 18**). Um den Nachweis für einen spezifischen Knockdown zu erbringen, wurde zusätzlich die Expression von *Tc-RhoGEF2* in *Tc-RhoGEF2* RNAi Embryonen analysiert. Dabei war ein deutlich schwächeres Signal zu erkennen, als in Wildtypembryonen (**Abb. nicht gezeigt**).



**Abb. 18** Expressionsnachweis der mRNA von *Tc-RhoGEF2* im WT. (A-B) Exemplarische Darstellung der ubiquitären Expression im Blastoderm (A) im jungen Embryo (B) und im elongierten Keimstreifen (C). (A'-C') Fluoreszente Kernvisualisierung mittels DAPI. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100 µm.

### 3.2.3. Phänotypische Analyse nach *Tc-RhoGEF2* RNA-Interferenz

RNAi Versuche für *Tc-RhoGEF2* wurden mit iBeetle-Fragmenten und mit selbst klonierten Fragmenten für die annotierten Gene *TC003070* (iB\_00510) und *TC032343* (iB\_03492) durchgeführt. Der Knockdown führte, mit Ausnahme von iB\_00510, für alle übrigen Fragmente zu qualitativ gleichen Ergebnissen. Für die statistische Auswertung wurden Kutikulapräparate der RNAi-Experimente mittels iB\_03492 Fragment verwendet. Insgesamt verursachte der Knockdown von *Tc-RhoGEF2* sehr starke Defekte auf Kutikulaebene. Oft war eine genaue Identifikation der Art der Körperanhänge nicht mehr möglich. Insgesamt konnten, soweit erkennbar, bei mindestens 29 % der analysierten Individuen deutliche Invertierungen von Kopf- und/oder Thorax-Anhängen festgestellt werden (siehe **Abb. 19**). Darüber hinaus wiesen über die Hälfte (mindestens 58 %) einen starken Defekt im Rückenschluss auf (siehe **Abb. 19B'**). Zu nur 5,7 % waren leere Eier zu sehen, d.h. es wurde keine Kutikula gebildet.



**Abb. 19 Phänotypische Ausprägung der larvalen Kutikula nach *Tc-RhoGEF2* RNAi.** (A) Wildtyp. (B-B') Kutikula in Ventralansicht mit offenem Abdomen (B) und Dorsalansicht mit offenem Rücken (B') als Resultat vorhergegangener S-Formbildung des Embryos im Ei (Vgl. Abb. 24E). (C) Invertierte Kopfanhänge sind äußerlich erkennbar, da ein Defekt im Rückenschluss vorliegt. Evertierter Hinterdarm (gestrichelte Linie), Ventralansicht. (D-F) Invertierte Extremitäten, teilweise äußerlich sichtbar. Ant Antenne; L1 Bein des 1. Thoraxsegments; Mx Maxille; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

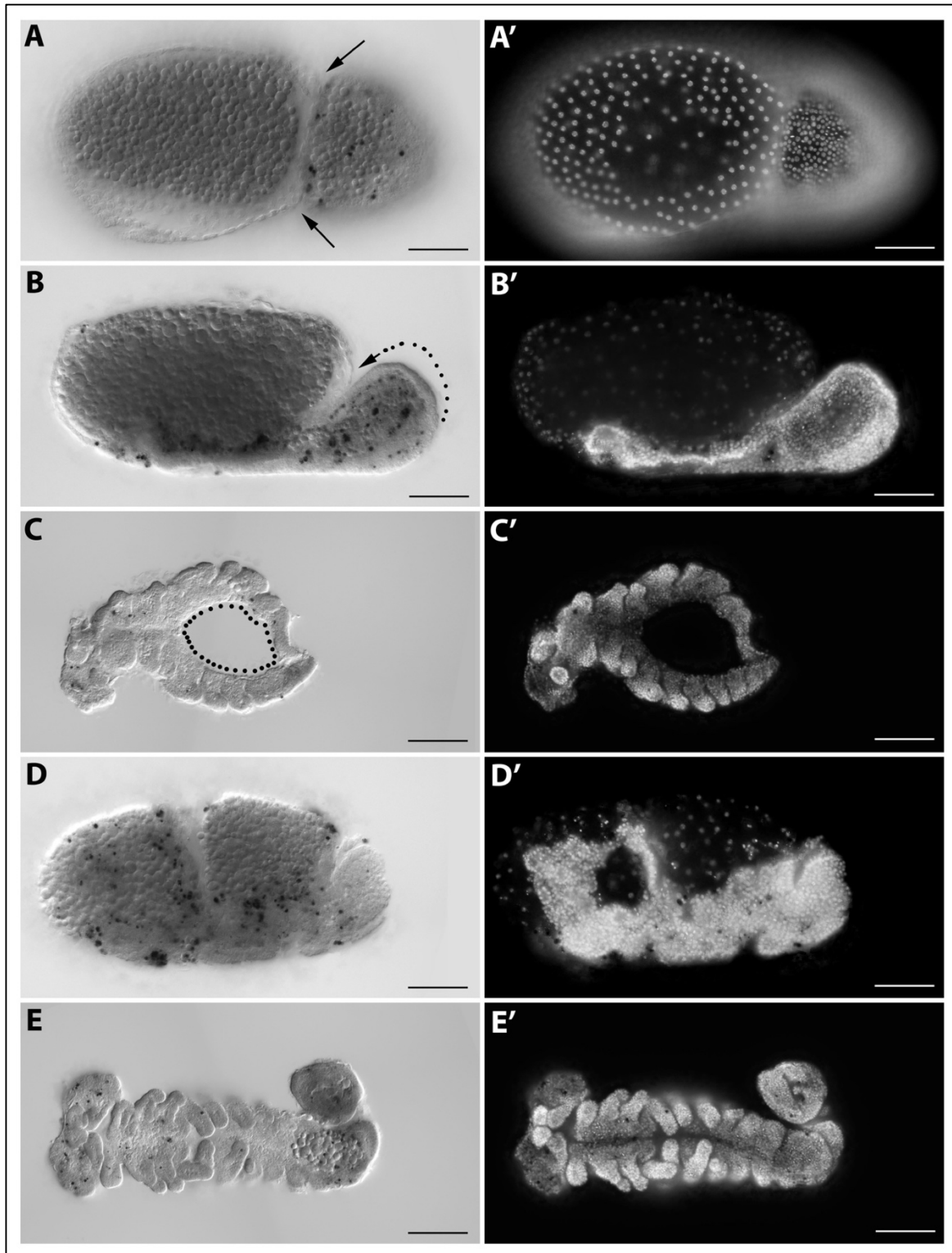
### 3.2.4. Embryonale Morphologie

Der Knockdown von *Tc-RhoGEF2* führte während der Bildung des Embryos und der extraembryonalen Membranen zu starken Defekten in der Direktionalität (siehe **Abb. 20** und **Abb. 24**). Ein häufig auftretender Phänotyp stellten Blastodermstadien dar, welche eine Einschnürung in der Region aufwiesen, in welcher die Differenzierung zwischen Amnion und Serosa erkennbar wird (siehe **Abb. 20A**). In anderen Fällen bildete sich zwar ein Embryo, jedoch kam es dann auch hier zu einem Defekt der Direktionalität extraembryonaler Membranen, vermutlich des Amnions. Dieses legte sich nach Dorsal über den Dotter, statt sich von posterior über die ventrale Seite des Embryos zu legen (siehe **Abb. 20B**). Weiterhin zeigten Lebendaufnahmen, wie das Gewebe eines jungen Embryos durch das Abreißen der Serosa nach lateral-dorsal gezogen wird und die Wachstums-Direktionalität des embryonalen Gewebes verändert (siehe **Abb. 23**). Diese Embryonen weisen im freipräparierten Zustand ein komplettes Fehlen von Gewebe median des Keimstreifens, als auch ein deformiertes Abdomen auf (siehe **Abb. 24H-J**).

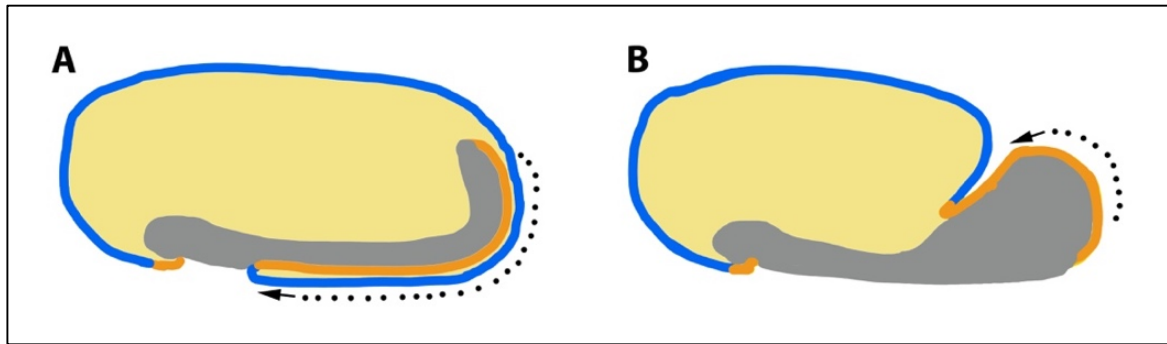
### 3.2.5. Programmierter Zelltod (Apoptose)

Aufgrund der starken Defekte, die durch den Knockdown von *Tc-RhoGEF2* verursacht wurden, war nicht auszuschließen, dass ein erhöhtes Zelltodaufkommen für einige Aspekte des Phänotyps verantwortlich sein könnte. Der Nachweis des programmierten Zelltods wurde mithilfe des kreuzreagierenden *Drosophila* Cleaved Dcp-1 Antikörpers (Cell Signaling Technology) im *whole-mount* Embryo durchgeführt. Als Vergleich dienten unbehandelte sowie UV-bestrahlte Wildtypembryonen (siehe **Abb. 16**). Dabei konnte in *Tc-RhoGEF2* RNAi-Embryonen weder ein reduziertes, noch ein verstärktes Signal im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp detektiert werden (siehe **Abb. 20**).





**Abb. 20** Expressionsnachweis von Dcp-1 nach *Tc-RhoGEF2* RNAi. (A) Wenige Dcp1-positive Zellen in Region der Konstriktion zwischen extraembryonalen Membranen (Pfeile) aufgrund der RNAi. (B) Einschnürung der Amnion-Serosa-Grenze verhindert die Faltung des Amnions nach Ventral (Pfeil). (C) Präparierter Embryo zeigt Öffnung im Thoraxbereich (gestrichelte Linie). Nur vereinzelt Dcp1-positive Zellen. (D) Defekte der Zellwanderungs-Direktionalität der Wachstumszone mit löchrigem Gewebe ohne erhöhtes Level Dcp1-positiver Signale. (E) Direktionalitätsdefekt der Bildung von Abdominalsegmenten. Nur vereinzelt Dcp1-positive Zellen. (A'-E') Fluoreszente Kernvisualisierung mittels DAPI. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

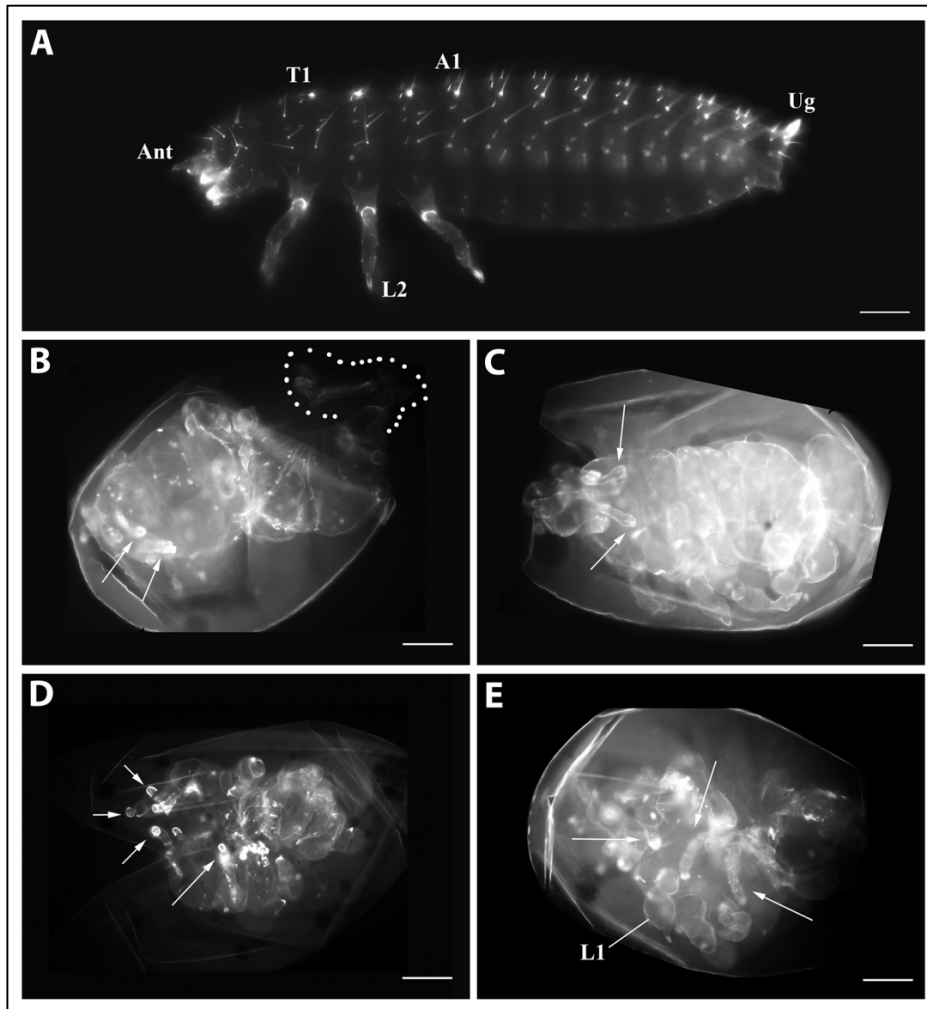


**Abb. 21** Direktionalität extraembryonaler Membranen in der Embryogenese. (A) Im Wildtyp zieht sich die Serosa (blau) nach ventral zusammen und das Amnion (orange) legt sich ventral über das embryonale Gewebe (grau) (Abb. verändert nach Horn & Panfilio, 2016). (B) Direktionalität extraembryonaler Gewebe ist defekt nach *Tc-ff* Knockdown. Das Amnion (orange) zieht nach Dorsal und bedeckt nicht das embryonale Gewebe.

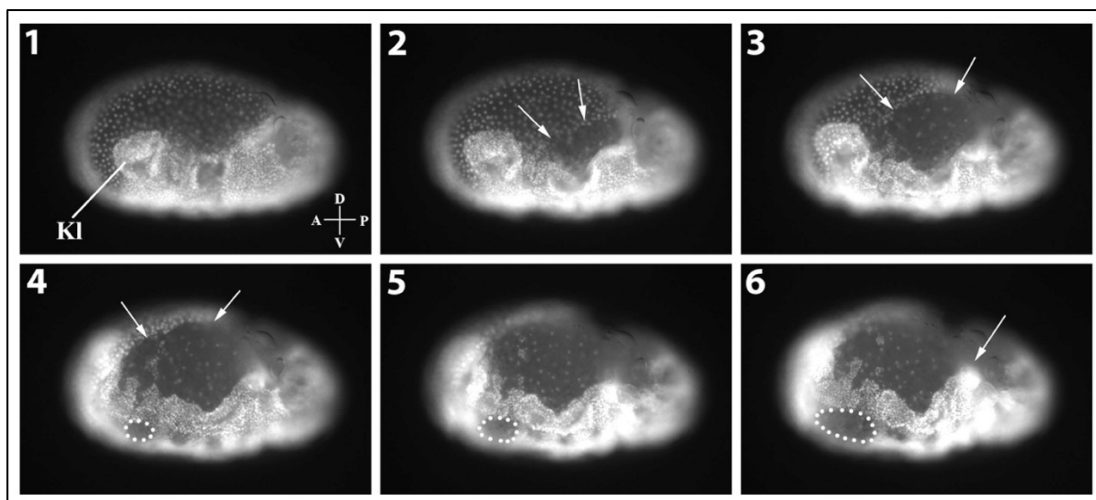
### 3.2.6. Doppel-Knockdown von *Tc-flipflop* und *Tc-RhoGEF2*

Die Resultate des kombinierten Knockdowns von *Tc-flipflop* und *Tc-RhoGEF2* beinhalteten durchgängig starke Defekte auf Kutikulaebene. Wildtypische Phänotypen, wie sie in Einzel-knockdowns für *Tc-ff* noch auftraten, waren hier nicht zu sehen. Stattdessen dominierte die Kombination einer stark deformierten Kutikula mit mehreren Invertierungsereignissen pro Individuum (siehe **Abb. 22**). Die fixierten Embryonen des Doppel-Knockdowns zeigten dementsprechend häufig eine durch den Dotter laufende, S-förmige Morphologie, was in fehlendem Gewebe median der Thorax-, bzw. Abdominalregion resultierte (siehe **Abb. 24F, H-J**).

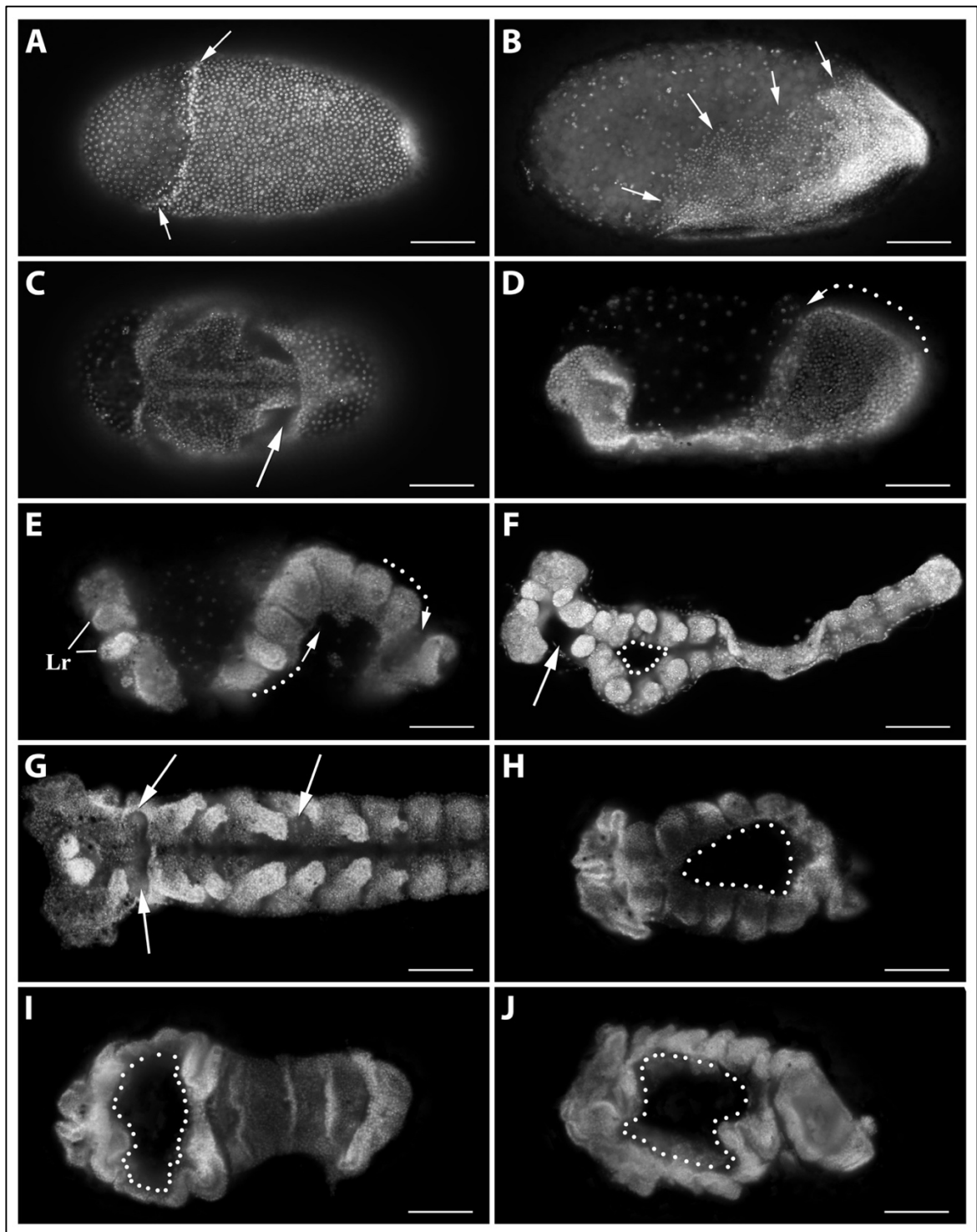
## Ergebnisse



**Abb. 22 Phänotypische Ausprägungen nach *Tc-ffl-RhoGEF2*-Doppel RNAi.** (A) Wildtyp. (B) Invertierte Kopfanhänge (Pfeile). Evertierter Hinterdarm (gestrichelte Linie). (C) Invertierte Antennen (Pfeile). Stark deformierte Beine und Abdomen. (D) Kutikularest mit mehreren Invertierungen (Pfeile). (E) Invertierte Beine und Kopfanhänge (Pfeile). Stark deformierte Beine. A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L1-2 Bein des 1./2. Thoraxsegments; Mx Maxille; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.



**Abb. 23 Live-Imaging nach *Tc-ffl-RhoGEF2*-Doppel RNAi.** (1) Junger Embryo weist teilweise löchriges Gewebe auf. (2) Ruptur der extraembryonalen Membranen (Pfeile) führt zum Auseinanderreißen embryonalen Gewebes (2-6), sodass ein Loch median der Thoraxregion (gestrichelte Linie) und ein Richtungsdefekt der Beinanlagen (6, Pfeil) entsteht.



**Abb. 24 Embryonale Morphologie nach RNAi.** (A, B, C, E) *Tc-flipflop* RNAi. (D) *Tc-RhoGEF2* RNAi. (F-H) *Tc-ffl-RhoGEF2* Doppel RNAi. (A) Vermutliche Amnion-Serosa-Grenze. (B) Defekt extraembryonaler Membranen. Ausgeweitetes embryonales Gewebe (Pfeile). (C) Ventralansicht eines vergrößerten Serosafensters (Pfeil). (D) Direktionalitätsdefekt in der Faltung extraembryonaler Membranen führt zur Verbreitung embryonalen Gewebes nach Dorsal (gestrichelter Pfeil). (E) Direktionalitätsdefekt verursacht S-Form Bildung des Embryos. (F) Invertierte Antenne und Mandibel (Pfeil). Fehlendes Gewebe im medianen Thoraxbereich (gestrichelte Linie). (G) Invertiertes Mandibelpaar und invertiertes Bein des 2ten Thoraxsegments (Pfeile). (H-J) Ventralansicht von Resultaten von S-Formbildung aufgrund von Direktionalitätsdefekten. Lochbildung median der Thoraxregion und Umfaltung des abdominalen Gewebes. Lr Labrum. Fluoreszente Kernvisualisierung mittels DAPI. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100 µm.

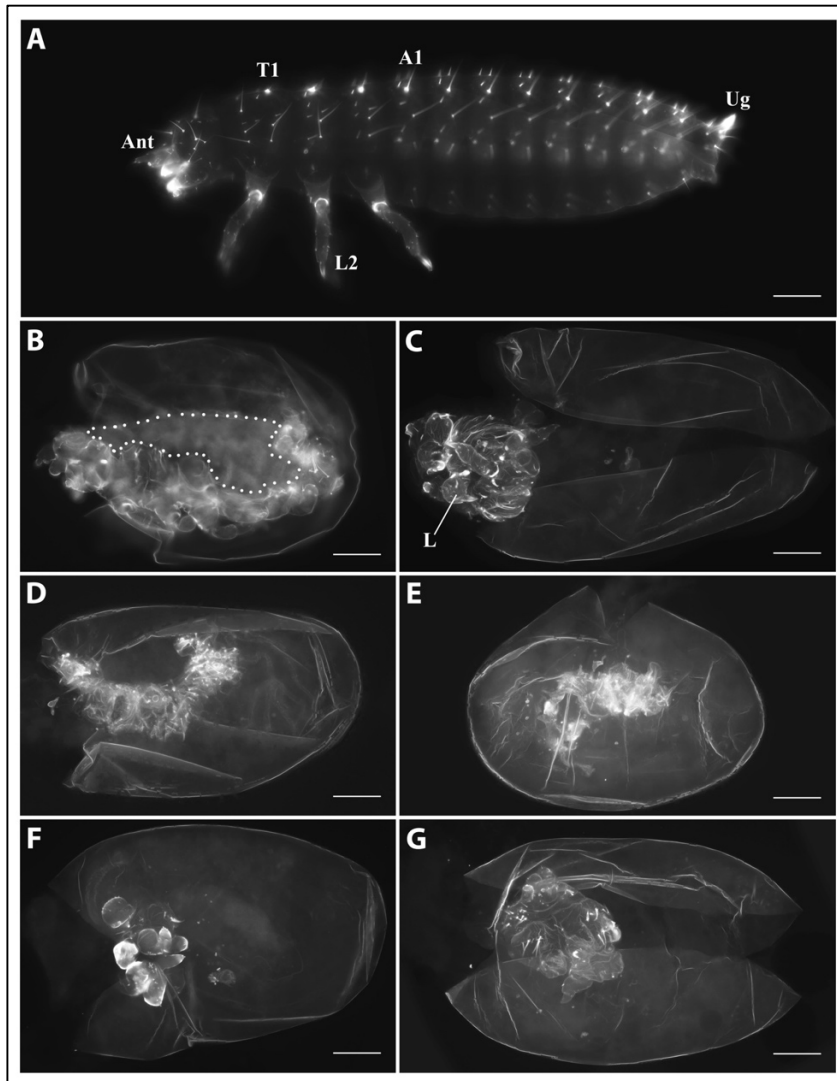
### 3.2.7. Weitere Rho-assoziierte Kandidaten

Um zu untersuchen, ob noch andere RhoGEF-ähnliche Gene an der Direktionalität der Extremitätenausrichtung beteiligt sind, wurden weitere RhoGEF-Kandidaten aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur RhoGEF2-Sequenz zur Analyse ausgewählt: *Tc-RhoGEF 17* (TC001759, iB\_02957,), *Tc-RhoGEF 64C* (TC003783, iB\_00613,), *Tc-RhoGEF 18* (TC009420, iB\_08587,), *Tc-Plekhg5* (TC014600, iB\_10103, Pleckstrin homology domain-containing family G member 5 isoform, *Tc-Plekhg5*) und *Tc-itsn2* (intersectin-2 isoform, TC032394, iB\_09756). Für RNAi-Versuche wurden jeweils die iB-Fragmente verwendet (Eupheria Biotech). Der Knockdown der Gene *Tc-RhoGEF 17*, *Tc-Plekhg5*, als auch *Tc-itsn2* zeigte keine Auswirkungen auf die Nachkommen injizierter Individuen. Die RNAi von *Tc-RhoGEF 64C* und *Tc-RhoGEF 18* resultierte zum Teil in starken Effekten, die eine statistische Analysen nicht ermöglichten. Auch bei verringerter Konzentration von bis zu 200 ng/μl legten mit *Tc-RhoGEF 64C* dsRNA injizierte Individuen kaum Eier. Sowohl für *Tc-RhoGEF 64C*, als auch für *Tc-RhoGEF 18* galt, dass Defekte zwar auftraten, diese jedoch nicht mit Invertierungsereignissen vergleichbar waren. Es wurden Abdomendefekte, "inside-out"-Phänotypen und nicht weiter analysierbare Kutikulareste beobachtet (siehe **Abb. 25**).

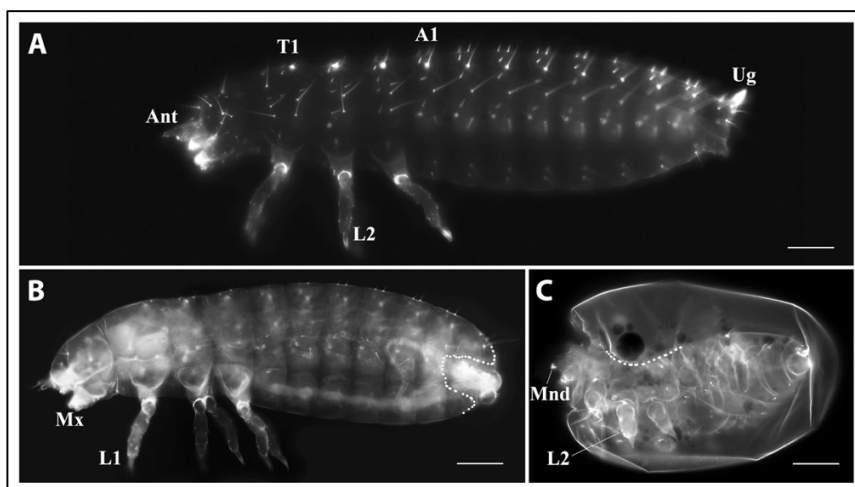
Andere ebenfalls analysierte Rho-assoziierte Kandidatengene stellten *RacGEF1* (TC011926), *RhoKv* (TC014703), *Rok* (TC014705), *Rap1* (TC006305) und *Kalirin* (TC003064) dar. RNAi-Versuche mit diesen Genen wurden mit eigens klonierten Fragmenten durchgeführt und ergaben keine Direktionalitäts-spezifischen Effekte. Lediglich das *Drosophila*-Homolog *Tc-Trio* (TC003063) wies nach dem Knockdown wenige invertierte Abdomen in den Nachkommen auf (siehe **Abb. 26**). An Mundwerkzeugen oder Beinen konnten keine Defekte der Direktionalität festgestellt werden. Trio ist ein GEF mit zwei DH-PH Modulen (Dbl homology, pleckstrin homology domain), wobei eins spezifisch für Rac ist und eins für Rho (Bishop & Hall, 2000).



## Ergebnisse



**Abb. 25 Phänotypische Varianzen nach *Tc-RhoGEF 18* RNAi.** (A) Wildtyp. (B) Offener Rücken. (C) Fehlende Abdominalsegmente. (D, E) "Inside-out" Phänotypen. (F, G) Kutikulareste von Kopfstrukturen. Ant Antenne; L Bein; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.



**Abb. 26 Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach *Tc-Trio* RNAi.** (A) Wildtyp. (B) Invertiertes Abdomen (gestrichelte Linie). (C) Verkürzte Beine und offener Rücken (gestrichelte Linie). A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L1-2 Bein des 1./2. Thoraxsegments; Mnd Mandibel; Mx Maxille; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

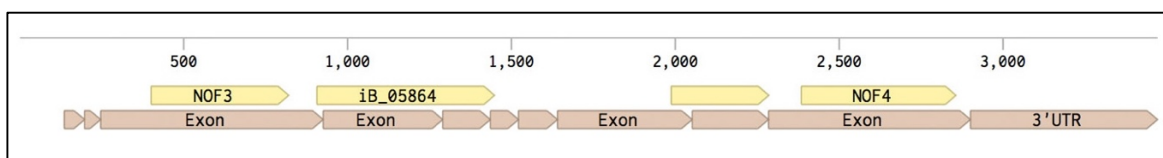
### 3.3. Analyse von Kandidaten des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs

Nichtkanonische Signalwege sind an vielen morphogenetischen Prozessen beteiligt, welche die (Re)organisation des Cytoskeletts, Zellmigration, -polarität, -adhäsion und konvergente Extension (CE, *convergent extension*) beinhalten (Green et al., 2014; Schlessinger et al., 2009; Tada & Kai, 2009). Aus diesem Grund wurden Komponenten nichtkanonischer Signalgebung als Kandidaten für diese Arbeit ausgewählt.

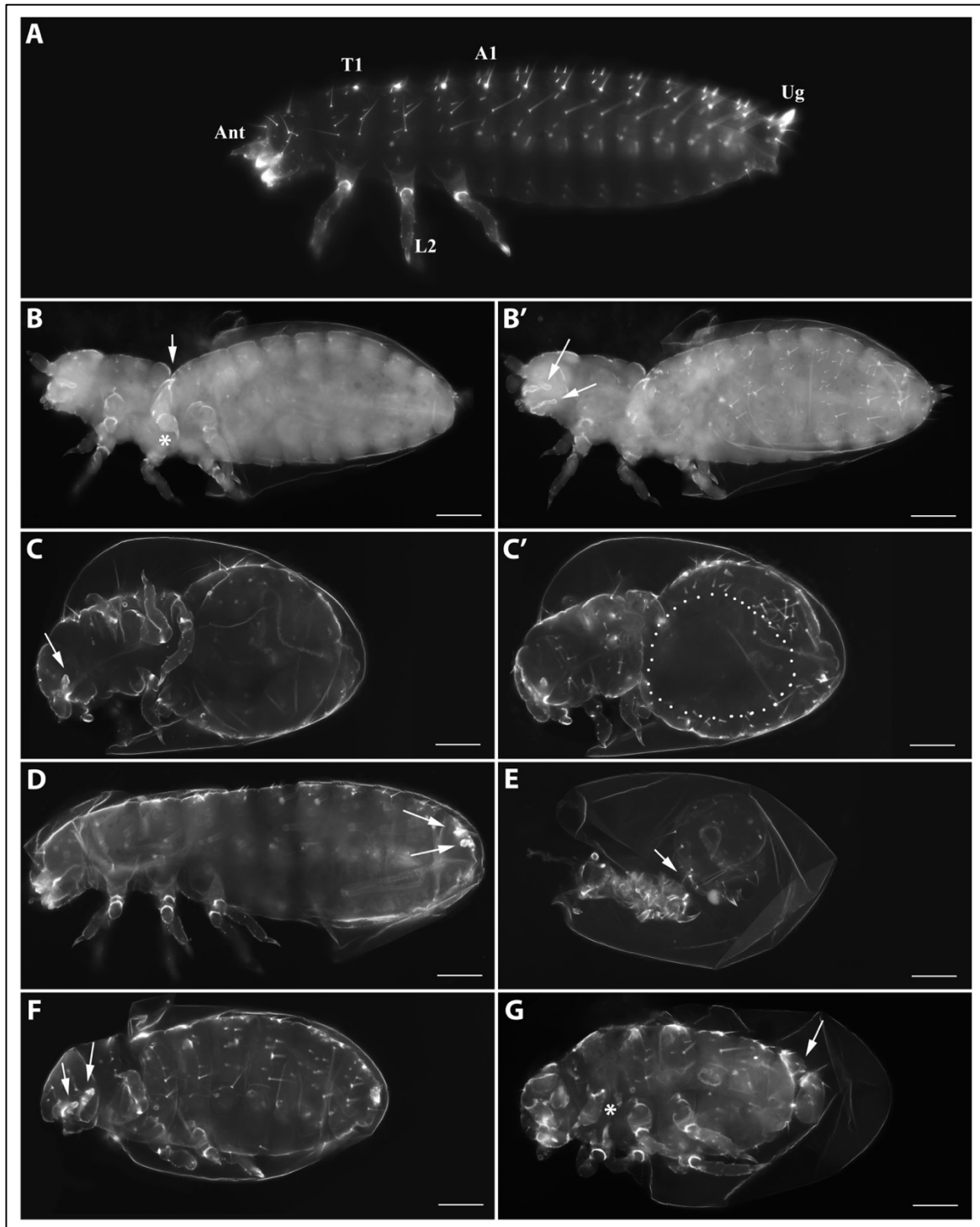
#### 3.3.1. Tyrosin-Proteinkinase Transmembranrezeptor *Tc-Ror1*

Als ein möglicher Kandidat für Direktionalität von Zellwanderung wurde *Tc-Ror1* (*receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1*) ausgewählt, da er als Co-Rezeptor eine entscheidende Rolle im nichtkanonischen Wnt-Signalweg spielt (Gentile et al., 2011). Bilder der iBeetle-Datenbank unterstützten diese Annahme.

Für Knockdown Versuche wurde zunächst das iBeetle-Fragment mit der Nummer iB\_05864 (*TC015667*) verwendet und entstandene Phänotypen auf Kutikulaebene ausgewertet. Dabei konnten bei auswertbaren Individuen (n=90) zu 49 % Invertierungen festgestellt werden, die sich meist auf die Kopfanhänge beschränkten (siehe **Abb. 28**). Des Weiteren wiesen 30 % der ausgewerteten Individuen eine verringerte Anzahl von Abdominalsegmenten (minimal vier) auf. In 10 % der Fälle entstanden "inside-out" Phänotypen. Am häufigsten waren Individuen mit defektem Rückenschluss (56 %) erkennbar. Darüber hinaus wurde zu 46 % keine Kutikula gebildet (von insgesamt n=268), sodass leere Eier entstanden. Dieses Ergebnis konnte jedoch weder mit einem nicht-überlappenden Fragment (iB\_05864\_2), noch mit zwei weiteren nicht-überlappenden, selbst klonierten Fragmenten (siehe **Abb. 27**) verifiziert werden.



**Abb. 27 Annotation der Genorganisation für *Tc-ror1*.** Verwendete NOFs sind in Gelb dargestellt. Der Knockdown mittels iB\_05864 Fragment wies unter anderem Invertierungsphänotypen auf (**Abb. 28**). Diese Phänotypen ließen sich mit keinem der drei NOFs bestätigen.



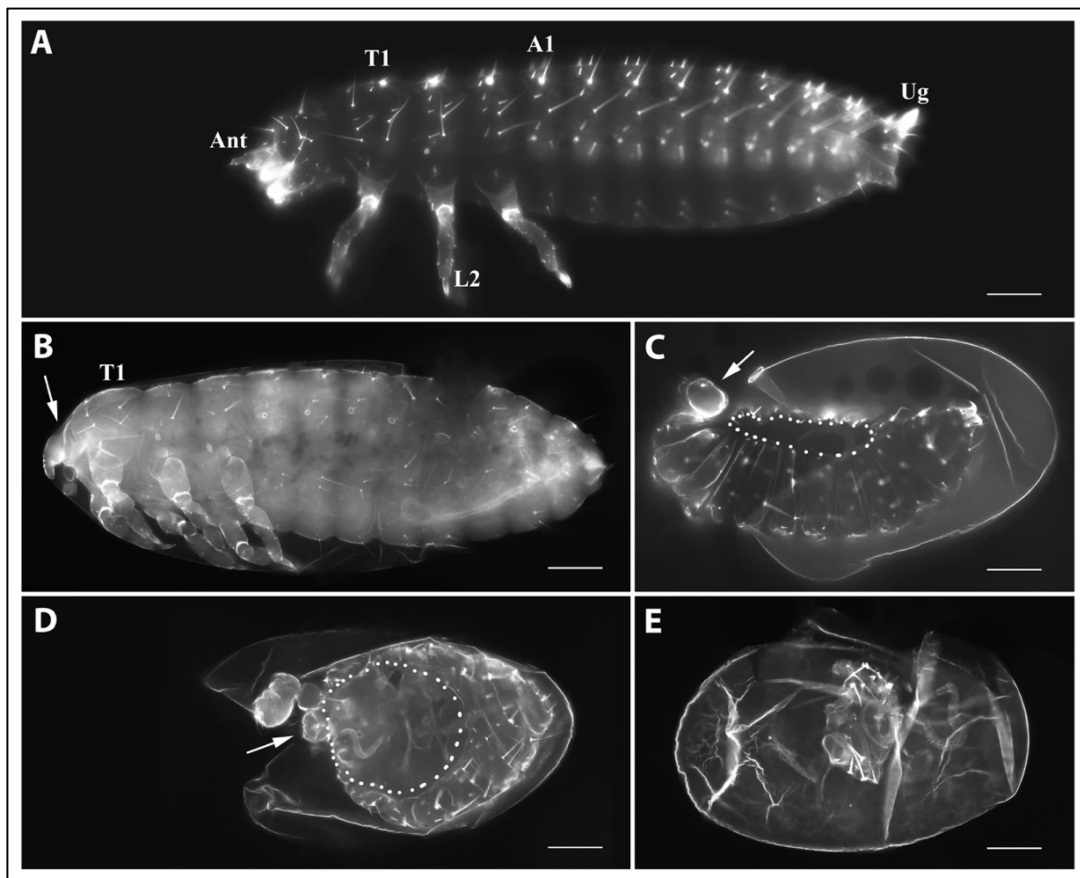
**Abb. 28** Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach *Tc-ror1* RNAi. (A) Wildtyp. (B-B') Kutikula in zwei Fokusebenen. (B) Verkürztes Bein (Sternchen) und Einschnürung im Thoraxbereich. (B') Invertierte Kopfanhänge. (C-C') Kutikula in zwei Fokusebenen. (C) Invertierte Mandibel (Pfeil). (C') Dorsalschlussdefekt (gestrichelte Linie). (D) Invertierte Urogomphi (Pfeile). (E) Partieller "inside-out" Phänotyp des Kopf- und Thoraxbereiches. (F) Invertierte Kopfanhänge (Pfeile) und deformierte Beine. (G) Verkürztes Bein (Sternchen). Abdominaldefekt (Pfeil). A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L2 Bein des 2. Thoraxsegments; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.



### 3.3.2. Weitere Kandidaten des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs

Als weitere Kandidaten des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs wurden der Ligand Wnt5 und Rezeptor Tyrosinkinase Proteine ausgewählt um sie auf ihre Funktion in *Tribolium* zu untersuchen. Unter ihnen die Gene, welche für die *Vertebraten*-Homologe Ryk (receptor-like tyrosine kinase, *TC010814*, *Dm-dnt*), Ptk7 (*TC032332*, iB\_03542, *Dm-otk* (*off-track*)) und Ror2 (*Dm-nrk*, *Neurospecific receptor kinase*) kodieren. Der Einzel- als auch Doppel-Knockdown mittels RNAi erbrachte weder für *Tc-Wnt5*, noch für *Tc-ryk* oder *Tc-ptk7* Effekte in der Entwicklung. Die Nachkommen wiesen hohe Schlupfraten mit wildtypischem Habitus auf (Ergebnisse nicht gezeigt).

RNAi-Versuche für das Gen *Tc-ror2* (*TC014181*, iB\_05579) zeigten keine Invertierungen, wie es für *Tc-ror1* der Fall war. Stattdessen waren Kopfdefekte (siehe **Abb. 29**), Kutikulareste und leere Eier zu sehen. Mit *Tc-flipflop*-Phänotypen übereinstimmend waren die Defekte im Rückenschluss (siehe **Abb. 29C, D**). Den überwiegenden Anteil machten jedoch auch in diesem Fall geschlüpfte Larven mit wildtypischem Habitus aus.



**Abb. 29** Phänotypische Varianz nach *Tc-ror2* RNAi. (A) Wildtyp. (B) Kopf reduziert (Pfeil). (C) Kopf nur noch als Kutikularest vorhanden (Pfeil). Dorsalschlussdefekt (gestrichelte Linie). (D) Kopf und Thoraxsegmente fehlen. Dorsalschlussdefekt (gestrichelte Linie). (E) Kutikularest. A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L2 Bein des 2. Thoraxsegments; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100 µm.

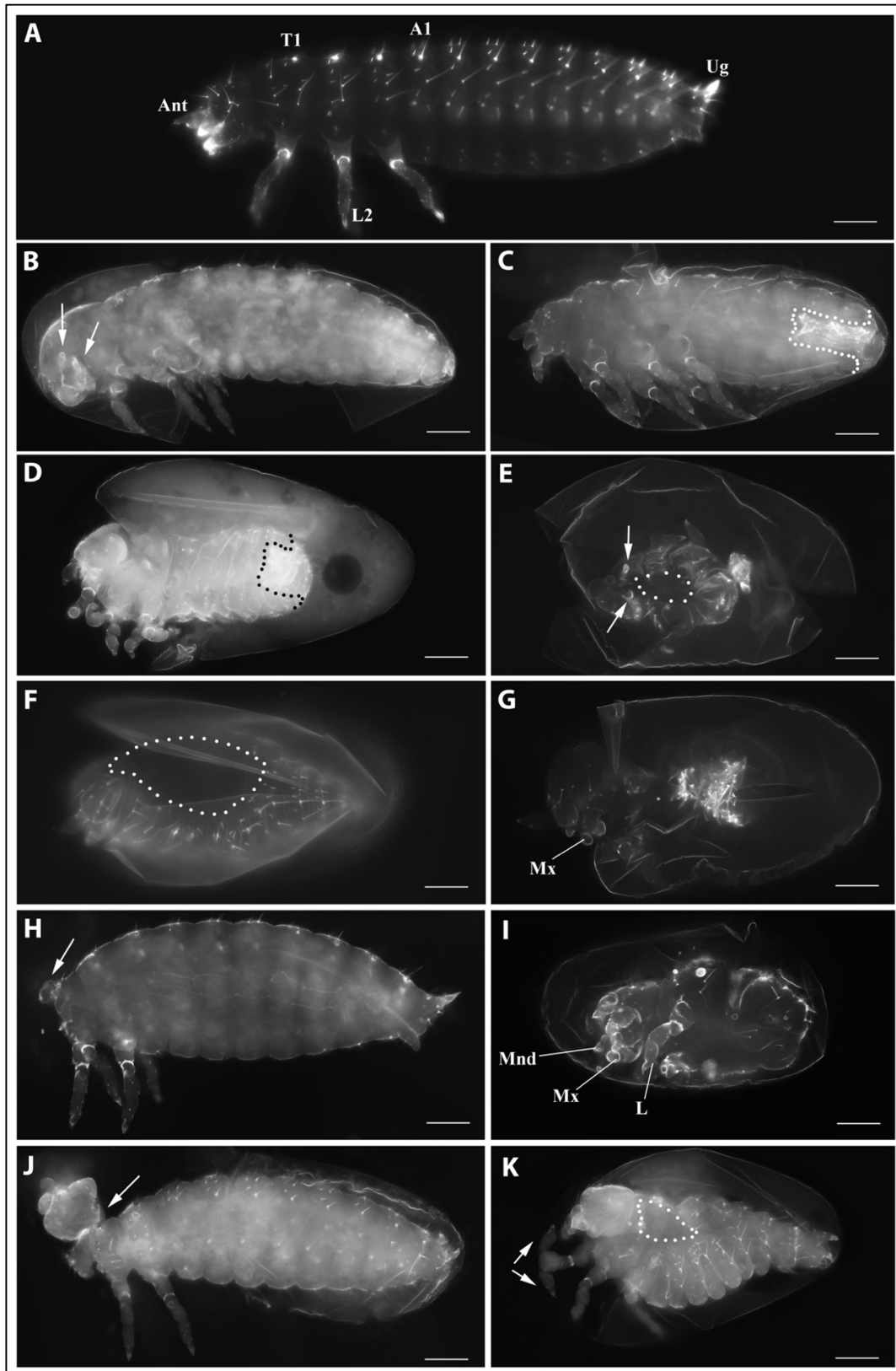
### 3.3.3. Ryk-like Tc-Cad96Ca

Das *Drosophila*-Homolog *Tc-Cad96Ca* (*Dm-Cad96Ca*, bzw. *Dm-stitcher*) galt durch seine hohe Sequenzähnlichkeit zu *Tc-ryk*, einem weiteren Faktor des nichtkanonischen Wnt-Signalweges, als weiterer möglicher Kandidat für Invertierungsereignisse. Der RNAi Knockdown von *Tc-Ryk* selbst erbrachte sowohl in der Einzel-, als auch in der Doppel-RNAi mit sequenzähnlichen Kandidaten keine Effekte (siehe 3.3.2). *Tc-Cad96Ca* kodiert für ein Cadherin und Tyrosinkinase Rezeptor, welcher hoch konserviert ist. In *Drosophila* ist das Gen am Aufbau von Aktinfilamenten bei der Wundheilung beteiligt (Wang et al., 2009).

Der Knockdown von *Tc-Cad96Ca* mittels RNAi resultierte zu einem Großteil in leeren Eiern (47 %), dem stärksten Phänotyp. Defekte im dorsalen Rückenschluss traten hier zu 44 % auf (siehe **Abb. 30D-F, K**). Invertierungsereignisse (siehe **Abb. 30A-D**) konnten zu 9,2 % festgestellt werden. Über diese mit *Tc-flipflop* vergleichbaren Defekte hinaus wurden weitere Phänotypen festgestellt: darunter zu 28 % "inside-out" Phänotypen (siehe **Abb. 30G**), Kopfdefekte, zu 15 % verkürzte Abdomen sowie vereinzelt deformierte und verschmolzene Beine.

### 3.3.4. *Tc-dishevelled* (*Tc-dsh*)

Das Gen *dishevelled* (*Tc-dsh*) galt als weiterer Kandidat des nichtkanonischen Wnt-Signalweges in Zusammenhang mit *Tc-ror1* und *Tc-Cad96Ca*. Der Gen-Knockdown von *Tc-dsh* führte zu sehr starken Defekten, die eine funktionelle Analyse anhand von phänotypischen Ausprägungen nicht ermöglichten. Sowohl bei einer dsRNA-Konzentration von 1 µg/µl, als auch bei Verdünnungen bis zu 100 ng/µl verstarben zum Teil bereits die injizierten Adulten, oder die Nachkommen entwickelten keine Kutikula.

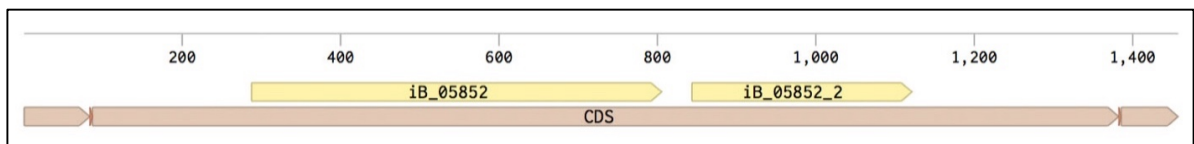


**Abb. 30** Phänotypische Varianz larvaler Kutikulas nach *Tc-Cad96Ca* RNAi. (A) Wildtyp. (B) Invertierte Kopfhänge (Pfeile). (C, D) Invertiertes Abdomen (gestrichelte Linie). (E) Invertierte Kopfhänge; (Pfeile) deformierte kurze Beine; Abdomen reduziert und umgestülpt. (F) Dorsalschlussdefekt (gestrichelte Linie). (G) Partieller "inside-out" Phänotyp des Abdomens. (H) Kopf und Thoraxsegment fehlend. (I) Thorax- und Abdominalsegmente fehlend. (J) Anteriordefekte. (K) Dorsalschlussdefekt; verschmolzene Beine (Pfeile). A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L Bein; Mnd Mandibel; Mx Maxille; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

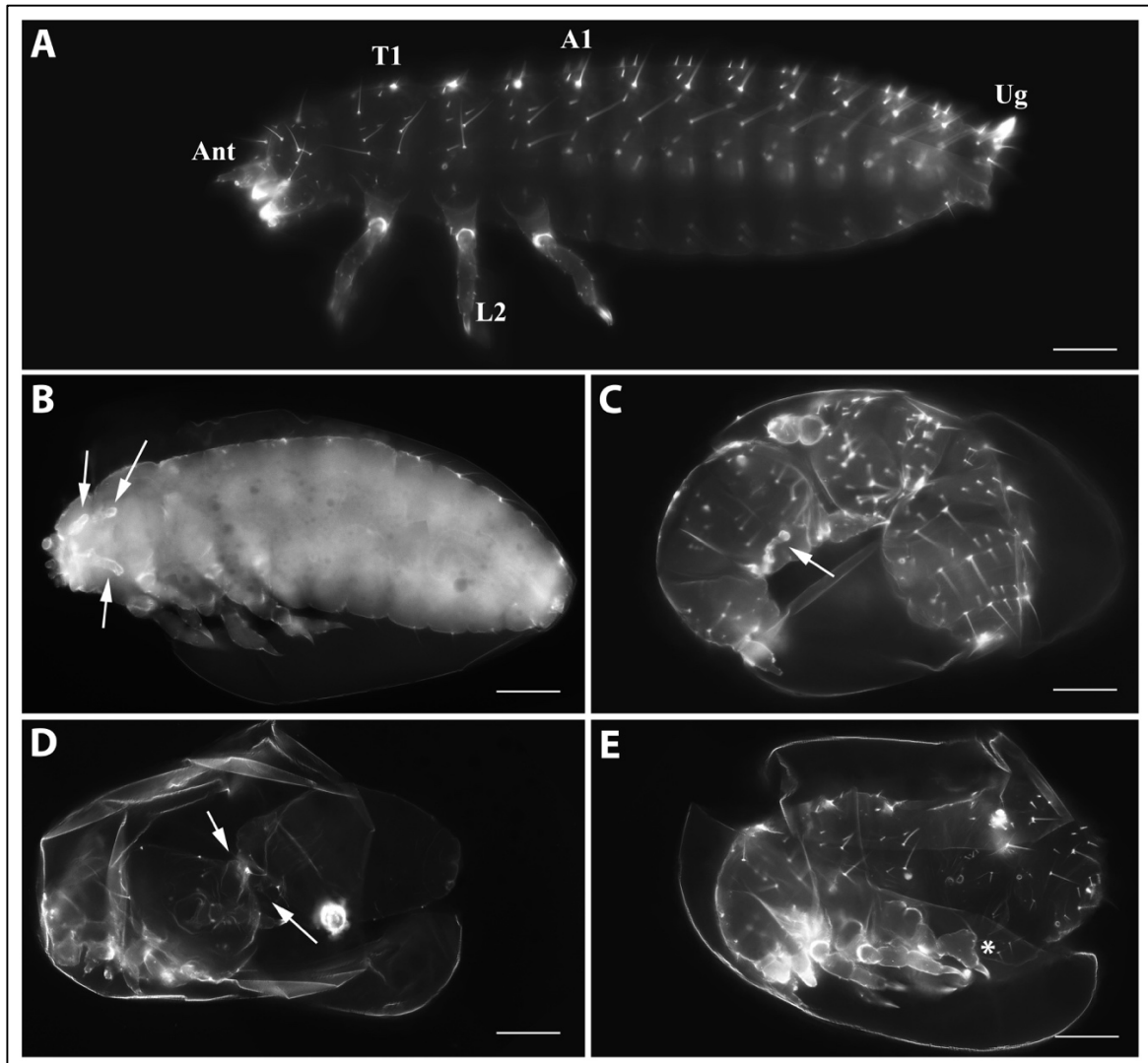
### 3.4. Zinkfinger *Tc-zfx*

Ein weiterer Kandidat, welcher dem iBeetle-Screen entnommen wurde, war das Gen *Tc-zfx* (*TC015629*, iB\_05852). Für den Gen-Knockdown wurde das von der Firma Eupheria Biotech GmbH synthetisierte iB-Fragment verwendet, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die parentale RNAi des Gens *Tc-zfx* resultierte zu einem überwiegenden Teil in geschlüpften wildtypischen Larven. Die wenigen nicht-geschlüpften Individuen zeigten zum Teil Invertierungen (siehe **Abb. 32B, C**), sowie andere Bildungsdefekte der Kopf- und Thoraxanhänge, Abdominaldefekte und Kutikulareste. Knockdown Versuche mittels nichtüberlappenden Fragments im 3'-Bereich (siehe **Abb. 31**) konnten diese Phänotypen nicht reproduzieren.

Zusätzlich wurden vier weitere Gene über ihre Sequenzähnlichkeit zu *Tc-zfx* analysiert. Dabei handelte es sich um Zinkfinger-Gene mit den Tc-Nummern *TC003827* (iB\_07043), *TC015072* (XX-90331-1), *TC015073* (XX-90332-1) und *TC015074* (XX-90333-1). Die Kandidaten wurden sowohl in Einzel- als auch in Doppel-RNAi Versuchen in jeder möglichen Kombination eingesetzt. Keiner der Versuche erbrachte vergleichbare Ergebnisse.



**Abb. 31** Annotation der Genorganisation und Lage der NOFs für *Tc-zfx*.



**Abb. 32 Phänotypische Varianzen larvaler Kutikulas nach *Tc-zfx* RNAi.** (A) Wildtyp. (B) Invertierte Kopfanhänge (Pfeile). (C) Invertiertes Bein (Pfeil). Beine teilweise fehlend. (D) Konstriktion des Abdomens (Pfeile). (E) Abdominalsegmente fehlen teilweise. Beindefekte (Sternchen). A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L Bein; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

### 3.5. *Tc-Cholin-Dehydrogenase (Tc-cdh)*

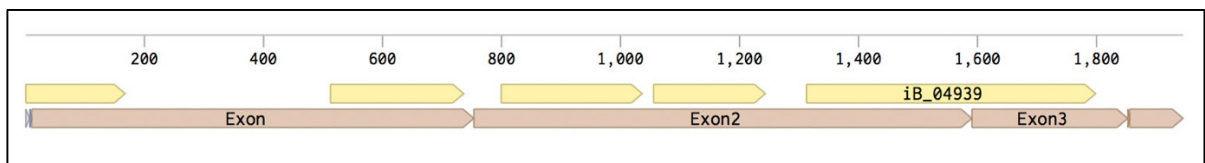
Das Gen mit der Nummer *TC010931*, welches für eine Cholin-Dehydrogenase kodiert, stellte einen weiteren Kandidaten für Invertierungs-Ereignisse dar. Dies basierte auf Grundlage von Knockdown Resultaten mittels des iB\_04939 Fragments im iBeetle-Screen.

In dieser Arbeit wurden sowohl eigens klonierte Fragmente, das ursprüngliche Fragment iB\_04939 (Eupheria), sowie vier nicht-überlappende Fragmente (iB\_04939\_2-5, Eupheria) für Knockdown Versuche verwendet (siehe **Abb. 33**). Die statistische Auswertung erfolgte, um Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, mit dem iBeetle Fragment iB\_04939. Der parentale Knockdown von *Tc-cdh* mittels iB\_04939 resultierte zu 88,9 % in Invertierungen

## Ergebnisse

bei auswertbaren Kutikulas. Dies stellt, im Vergleich mit allen in dieser Arbeit untersuchten Genen, den höchsten Anteil an Invertierungsereignissen dar. Ein Defekt im Dorsalschluss entstand bei 31,7 % der Individuen (siehe **Abb. 34**), wildtypische Phänotypen waren zu 9,8 % zu sehen. Der stärkste Effekt nicht-gebildeter Kutikula, die leeren Eier, trat insgesamt zu 36,3 % auf. Jedoch konnten diese Resultate mit keinem der vier, von der Firma Eupheria synthetisierten, noch mit selbst klonierten, nicht-überlappenden Fragmenten repliziert werden.

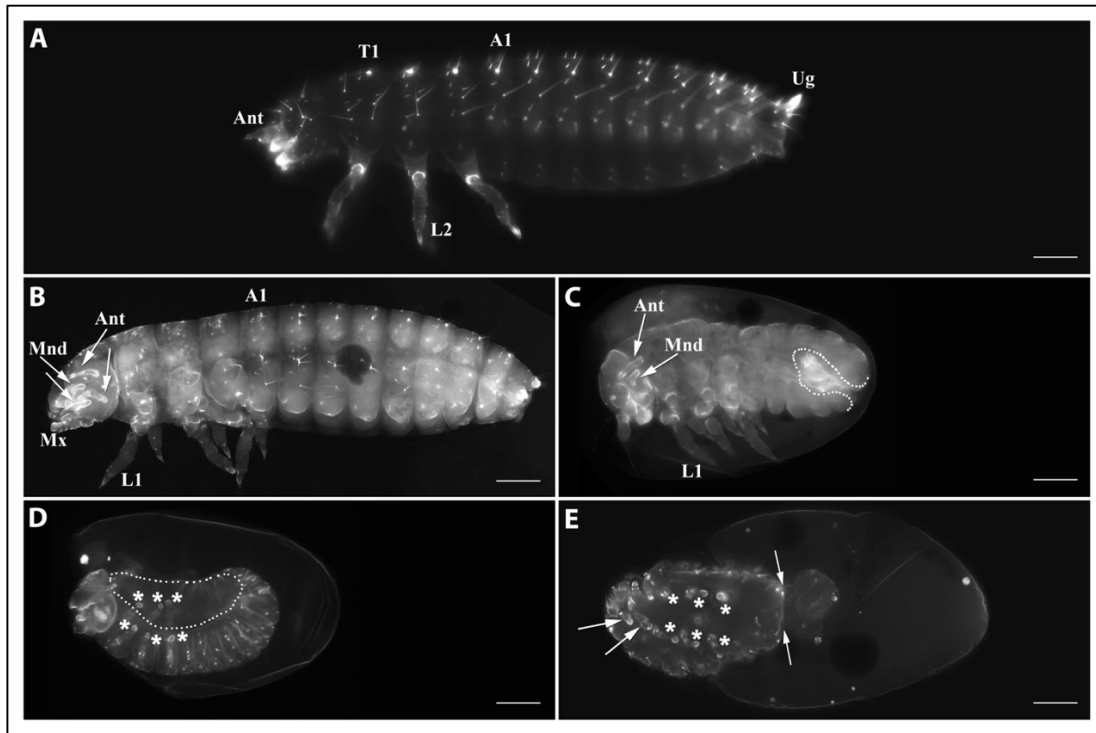
Da zum Teil signifikante Sequenzübereinstimmungen von *Tc-cdh* zu anderen Genen existieren, wurden die vier mit der höchsten Übereinstimmung über BLAST ausgewählt und deren iB-Fragmente (Eupheria Biotech) ebenfalls in adulte Käfer injiziert. Bei allen Kandidaten handelte es sich um Gene, welche ebenfalls für Cholin/Glucose-Dehydrogenasen kodieren. Dazu gehörten die Gene mit den annotierten Nummern *TC016355* (iB\_09229), *TC033300* (iB\_05806), *TC015717* (iB\_05882) und *TC015718* (iB\_05883). Knockdown Versuche wurden sowohl im Einzel- als auch im Doppelansatz mit jeweils zwei dieser Kandidaten in jeder möglichen Kombination durchgeführt. Keine der RNAi's resultierte in mit *Tc-cdh*<sup>RNAi</sup> und *Tc-flipflop*<sup>RNAi</sup> vergleichbaren Phänotypen. Zu einem überwiegenden Teil waren geschlüpfte wildtypische Larven zu verzeichnen. Der Knockdown des Gens *TC015717* resultierte in unspezifischen Defekten (siehe **Abb. 35**).



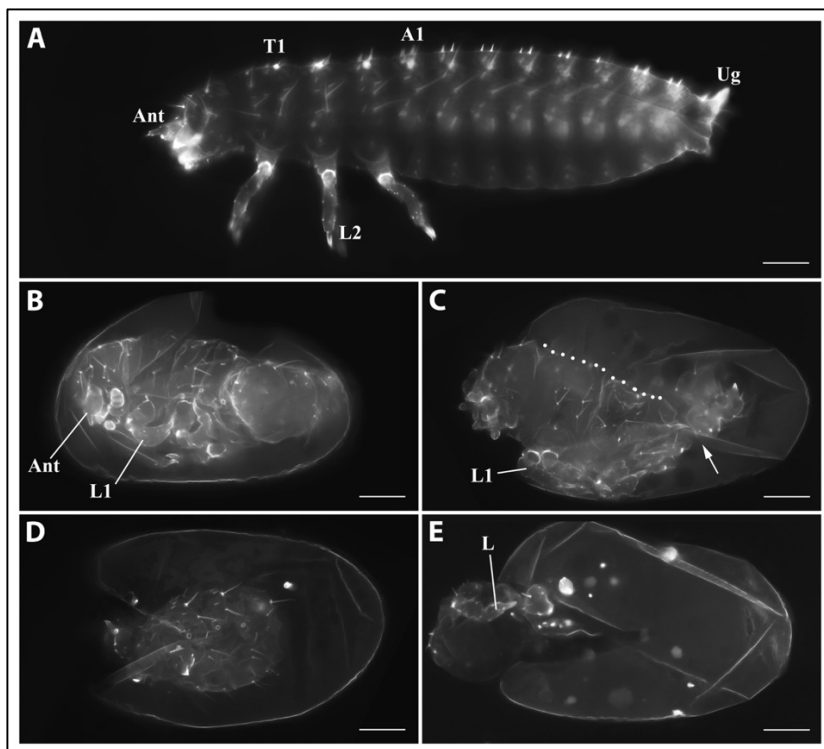
**Abb. 33 Annotation der Genorganisation und NOF-Position für *Tc-cdh*.** Verwendete NOFs sind in Gelb dargestellt. Der Knockdown mittels iB\_04939 Fragment zeigte einen hohen prozentualen Anteil invertierter Extremitäten (**Abb. 34**). Knockdown Versuche mittels vier weiterer NOFs konnten diese Phänotypen nicht reproduzieren.



## Ergebnisse



**Abb. 34 Phänotypische Ausprägungen nach *Tc-cdh* RNAi.** (A) Wildtyp. (B) Invertierte Mandibeln und Antennen (Pfeile). (C) Invertierte Mandibel und Antenne (Pfeile). Invertiertes Abdomen (gestrichelte Linie). (D) Invertierung aller Beine (Sternchen). Dorsalschlussdefekt (gestrichelte Linie). (E) Invertierte Kopfhänge (Pfeile). Invertierung aller Beine (Sternchen). Konstriktion abdominaler Segmente (Pfeile). A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L1 Bein des 1. Thoraxsegments; Mnd Mandibel; Mx Maxille; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.



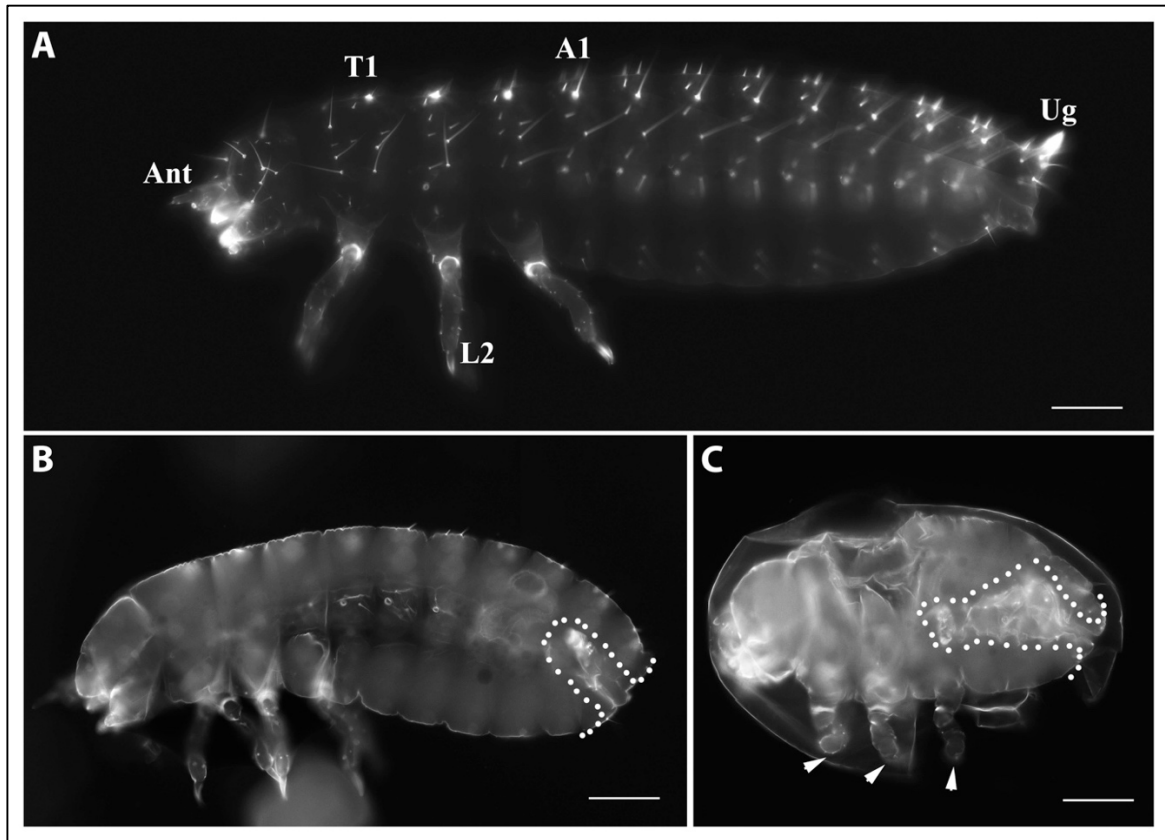
**Abb. 35 Phänotypische Varianzen nach *Tc-cdh-like TC015717* RNAi.** (A) Wildtyp. (B) Beine deformiert. Abdominaldefekte. (C) Dorsalschlussdefekt (gestrichelte Linie). Konstriktion des Abdomens (Pfeil). (D, E) Kutikulareste mit anterior-posterior Defekten. A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L1-2 Bein des 1./2. Thoraxsegments; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m.

### 3.6. *Tc-DEAF1* und andere Kandidaten

Das *Drosophila* Homolog *Tc-DEAF1* (Deformed epidermal autoregulatory factor-1, *TC000085*) galt, basierend auf Abbildungen in der iBeetle Datenbank, als ein weiterer Kandidat für Direktionalität von Gewebewachstum. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher nach seiner Bindeeigenschaft an das homeotische Response Element von *Deformed* (*Dfd*) benannt ist (Gross & McGinnis, 1996). Der Knockdown des *Tc-DEAF1* Gens führte zum Teil zu verkürzten deformierten Beinen und invertierten Abdomen (siehe **Abb. 36**). Dabei konnten jedoch weder an den Beinen noch an den Mundwerkzeugen Invertierungsereignisse festgestellt werden.

Des Weiteren wurden im Zuge dieser Arbeit mehrere Kandidatengene kloniert und analysiert, welche nach Knockdown keine Defekte in direktionalem Wachstum oder der Beinentwicklung aufwiesen. Die Auswahl dieser Kandidaten richtete sich nach aus der Literatur bereits bekannten Faktoren, welche in Zellformveränderungsprozesse involviert und/oder Rho-assoziiert sind. Zu diesen Kandidaten gehörten die *Drosophila* Homologe *Tc-dco* (discs overgrown, *TC034052*), *Tc-zip* (zipper, Myosin, *TC034132*, iB\_03972), *Tc-Mer* (Merlin, *TC014860*), *Tc-mcm* (mini-chromosome maintenance complex-binding protein, *TC003148*), *Tc-garz* (gartenzwerg, *TC005830*), *Tc-mnb* (minibrain, *TC007717*), *Tc-pav* (pavarotti, *TC013058*), *Tc-riq* (riquiqui, *TC012028*), *Tc-sd* (scalloped, *TC032219*), *Tc-tum* (tumbleweed, *TC010549*), *Tc-yki* (yorkie, *TC04769*) und *Tc-Dip-C* (Dipeptidase C, *TC031503*). Darüber hinaus wurden iBeetle-Kandidaten ausgewählt, deren RNAi-Phänotypen im Screen Hinweise auf ein *Tc-flipflop*-ähnliches Syndrome gaben. Dazu zählten die Gene *TC000592* (iB\_00134), *TC002426* (iB\_00371), *TC006631* (iB\_01072) und *TC004796* (iB\_03849). In der Regel führten Knockdown Versuche mit diesen Genen zu unspezifischen, bzw. keinen Effekten. Die RNAi für das *Drosophila* Homolog *Tc-zipper* führte aufgrund der Schwere der Defekte bereits zum Tod der injizierten Weibchen und konnte daher nicht funktionell untersucht, als Kandidat daher jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.





**Abb. 36** Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach *Tc-DEAF* RNAi. (A) Wildtyp. (B, C) Invertiertes Abdomen (gestrichelte Linie). (C) Beindefekte. A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L2 Bein des 2. Thoraxsegments; T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100 µm.

### 3.7. Kontrollversuch mittels *Tc-distalless* (*Tc-dll*) RNAi

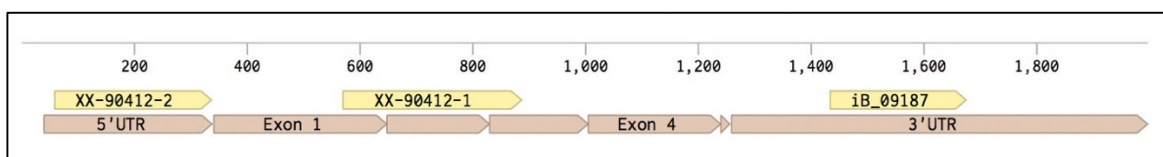
Um festzustellen, inwiefern Invertierungsereignisse unspezifisch zufällig auftreten können, wurden RNAi Versuche mit einem bekannten Gen durchgeführt, welches bereits von mehreren Arbeitsgruppen ausführlich analysiert wurde, und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Für diese Arbeit wurde das *Tribolium* Homolog *Tc-distalless* (*Tc-dll*, *TC009351*) ausgewählt, da dessen Funktion in der Entwicklung von Beinen und Kopfanhängen bereits gut untersucht ist (Beermann et al., 2001). Des Weiteren sollte die Spezifität und Reproduzierbarkeit von Knockdown Versuchen mittels nicht-überlappender Fragmente getestet werden, da es häufig zu starken Unterschieden in Kandidatenanalysen kam. Dazu wurden *Tc-dll* RNAi-Versuche mit drei nicht-überlappenden Fragmenten durchgeführt und statistisch ausgewertet: Eins in der 5'-UTR (XX-90412-2), eins für die kodierende Region (XX-90412-1, Exon 1 bis 3) und eins in der 3'-UTR (iB\_09187) (siehe **Abb. 37**). Dabei kam es zu unterschiedlichen, stark NOF-spezifischen Resultaten der Knockdown Phänotypen.

## Ergebnisse

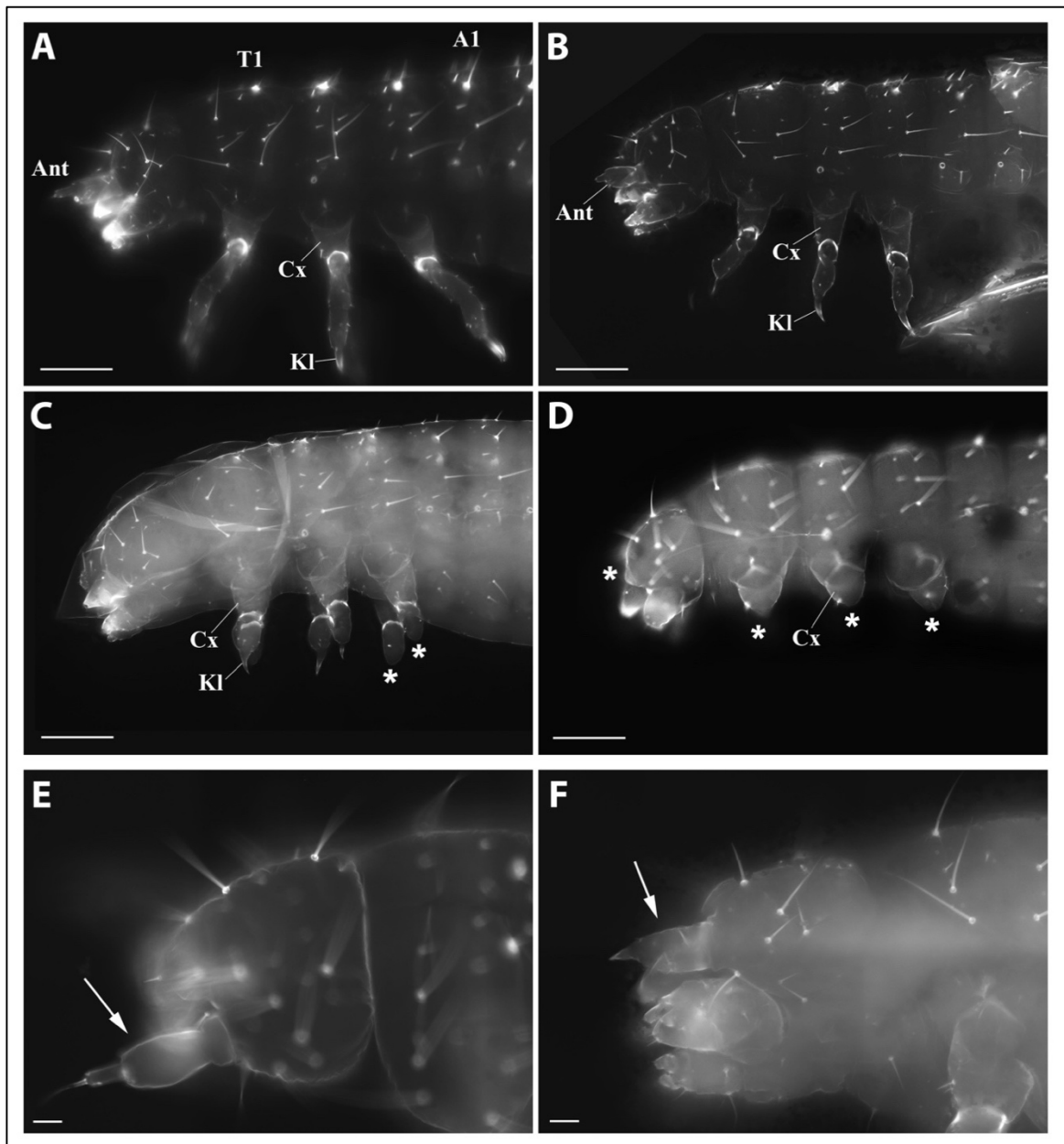
So konnten mittels Knockdown des Gens *Tc-distalless* für das 5'-Fragment, trotz einer Schlupfrate von 52,8 %, zu 100 % schwache Beinphänotypen festgestellt werden (n=125). Dabei waren die Beine meist verkürzt und leicht deformiert, die distale Klaue jedoch häufig noch vorhanden. Bei 92,8 % fehlte lediglich das distale Antennensegment (Flagellum). Die Antenne selbst wurde aber immer gebildet. Leere Eier waren zu 8 % vorhanden (n=137), Defekte im Rückenschluss sowie Invertierungsereignisse konnten nicht festgestellt werden.

Während das Fragment des 5'-UTR-Bereiches vorwiegend schwache Defekte lieferte (siehe oben), entstanden nach dem Knockdown mittels Fragment im Bereich der kodierenden Sequenz (XX-90412-1) durchweg stärker ausgeprägte Defekte. Dabei waren zu 93,2 % (n=148) nur noch das erste, bzw. maximal die ersten zwei proximalen Beinsegmente Coxa und Trochanter vorhanden (siehe **Abb. 38D**). Der entsprechend schwächere Phänotyp mit vorhandener Klaue konnte lediglich einmal identifiziert werden. Des Weiteren fehlten die Antennen bei 93,2 % der Individuen vollständig, bei 2 % war lediglich das basale Antennensegment vorhanden. Zu 3,2 % (n=157) wurde keine Kutikula gebildet (leere Eier), bei 2,5 % entstand nur ein Kutikularest. Rückenschlussdefekte konnten zu 1,4 % festgestellt werden.

Der Knockdown mittels 3'-UTR Fragment (iB\_09187) resultierte zu 96,6 % in genspezifischen Effekten verkürzter Extremitäten (siehe **Abb. 38**). Dabei handelte es sich zu 96,6 % (n=201) um einen schwachen Phänotyp, bei dem die Beine zwar verkürzt, distale Segmente (Klaue) jedoch noch vorhanden waren. Dies ist vergleichbar mit den RNAi Phänotypen des 5'-UTR Fragmentes. Nur bei zwei Individuen entstand mit diesem Fragment ein starker Phänotyp ohne distale Beinsegmente. Weiterhin kam es bei 51 % (n=100) zu einer Transformation der Antennen zu Beinen (siehe **Abb. 38F**), bzw. zu einer partiellen Transformation (49 %). Leere Eier traten zu 4,6 % (n=218), wildtypische Larven zu 1,4 % (n=208) auf. Defekte im Rückenschluss, wie sie auch in den Knockdown Versuchen anderer hier untersuchten Gene zu beobachten waren, entstanden zu 1,4 %. Invertierungsereignisse traten bei keinem der Individuen auf.



**Abb. 37** Annotation der Genorganisation und Lage der NOFs für *Tc-dll*. Das im kodierenden Bereich liegende Fragment (XX-90412-1) zeigte starke *dll*-Phänotypen. Knockdown Versuche mittels Fragmente in den UTRs zeigten schwache Phänotypen (siehe **Abb. 38**).



**Abb. 38 NOF-spezifische phänotypische Ausprägungen nach *Tc-dll* RNAi.** (A) Wildtyp. (B) Knockdown mittels Fragment in 5'-UTR zeigte verkürzte Beine, häufig mit Klaue. Flagellum der Antenne meist fehlend. (C) Knockdown mittels Fragment in 3'-UTR führte zu verkürzten Beinen, häufig mit Klaue. (D) Knockdown mittels Fragment in der kodierenden Region führte zu starken Phänotypen mit kurzen Beinen (nur Coxa zu sehen, mit Sternchen gekennzeichnet) und Fehlen der Antenne (Sternchen). (E) Antenne des Wildtyps (Pfeil) (F) Knockdown mittels 3'-UTR Fragment. Transformation der Antenne zum Bein (Pfeil). A1 Abdominalsegment 1; Ant Antenne; L2 Bein des 2. Thoraxsegments; Cx Coxa; Kl Klaue. T1 Thoraxsegment 1; Ug Urogomphi. Anterior-Posterior-Achse von links nach rechts. Maßstab 100  $\mu$ m (A-D), 20  $\mu$ m (E-F).

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das neue Gen *Tc-flipflop* auf seine Funktion hin untersucht und in einen entwicklungsbiologischen und zellbiologischen Zusammenhang eingeordnet werden. Dabei sollten zellmorphologische Prozesse beschrieben, und das Gen auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Des Weiteren sollten interagierende Kandidaten identifiziert werden, um Hinweise auf eine Einordnung in bekannte Signalwege zu erhalten.

### 4.1. Das Waisenkind *flipflop*

Die Ausbildung von Beinen unterscheidet sich grundlegend im Vergleich von *Tribolium* und *Drosophila*. Während die embryonalen Beinanlagen bei *Drosophila* als Imaginalscheiben im Inneren der Larve invaginiert und daher nicht äußerlich erkennbar sind, entwickelt *Tribolium*, wie auch die Embryonen der meisten anderen Arthropoden, evaginierte, nach außen gestülpte Anlagen - die Beinknospen, die sich zu deutlich sichtbaren, segmentierten Beinen der Larve verlängern (Beermann et al., 2001). Die Anlage des Beinfeldes wie auch die Segmentierung des Beines unterliegen dabei maternalen Faktoren und Segmentierungsgenen (Ingham, 1988; Nüsslein-Volhard et al., 1987). Über den richtungsgebenden Prozess und die darin beteiligten Faktoren, welche die primäre Ausstülpung des Gewebes initiieren, ist jedoch nur wenig bekannt. Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Gene *Tc-flipflop1* und *Tc-flipflop2* bei diesem Entscheidungsprozess eine zentrale Rolle spielen.

Das Gen *Tc-flipflop1* wurde im Zuge des iBeetle-Pre-Screens (Dönitz et al., 2014) aufgrund seines bisher nie gesehenen Phänotyps der invaginierten Beine identifiziert. *flipflop1* und ein weiteres von mir im Genom von *Tribolium* identifiziertes *flipflop*-Homolog (*flipflop2*) enthalten jeweils zwei kurze Exons die für kleine Proteine (136 AS bzw. 127 AS) kodieren und keine bekannten konservierten Domänen aufweisen. Weiterhin gelten beide Gene als "unstrukturiert" (siehe unten). Über eine BLAST-Suche konnten Homologe bisher nur in nahe verwandten *Tribolium*-Arten (*T. confusum*, *T. madens* oder *T. freemani*) (UCSC Genome Browser), jedoch in keinem weiteren sequenzierten Genom gefunden werden. Somit kann *Tc-flipflop* als evolutionär neues (novel) oder Orphan- ("Waisenkind") Gen beschrieben werden. Auch die Größe der beiden Gene könnte diese Einordnung untermauern, da kleine Gene tendenziell evolutionär jünger zu sein scheinen (McLysaght & Hurst, 2016).

Die Sequenzen mehrerer unabhängiger *Tc-flipflop*-cDNA-Klone wiesen eine Vielzahl von Unterschieden in der Basenabfolge auf. Dies kann einen Hinweis auf die Hypervariabilität der *flipflop*-Gene darstellen, von denen jedes Genprodukt leicht unterschiedliche Funktionen

durchführen könnte. Alternativ könnten die *flipflop*-Gene evolutionär so neu sein, dass sie (immer noch) selektiven Veränderungen unterworfen sind. Diese Unterschiede einzelner Basen sind sowohl innerhalb des San Bernardino (SB) Stamms, als auch im Vergleich von San Bernardino und Georgia (GA-2) Stamm zu finden. Während der SB-Stamm Grundlage der verwendeten cDNA aller in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war, basiert die Genomannotation in den verwendeten Datenbanken auf dem Genom-Sequenzierungs-Projekt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/73486647?report=genbank>) mittels Georgia GA2-Stamm (Richards et al., 2008).

Eine Voraussetzung für die Einordnung als neues Gen ist die Eigenschaft der RNA, Protein-kodierend zu sein, um sie von nicht-kodierenden RNAs unterscheiden zu können. Die Schwierigkeit, eine Sequenz nicht-kodierender RNAs zuzuordnen, besteht vor allem in dem Fehlen detaillierter Definitionen. Im Allgemeinen werden small RNAs (kleine RNAs) wie micro-, PIWI-assoziierte, oder small interfering (si) RNAs unterschieden von long non-coding (lnc) RNAs. LncRNAs haben die Fähigkeit die Expression von Genen beispielsweise über Chromatin-Modifikation, als auch (post-) transkriptionelle Regulation zu beeinflussen (Fatica & Bozzoni, 2014; Mercer et al., 2009). Während small RNAs wesentlich besser definiert sind, ist die Einordnung im Falle von lncRNAs jedoch nicht trivial. Eine RNA gilt als lang, wenn sie etwa aus mehr als 200 Nukleotiden besteht. Die Unterscheidung, ob es sich dann um eine kodierende, oder eine nicht-kodierende RNA handelt, ist nicht unbedingt eindeutig. Dies wird hauptsächlich an der Qualität und Länge der in der Sequenz vorliegenden ORFs (Open Reading Frame, Leserahmen) und der damit verbundenen Fähigkeit, Protein-kodierend zu sein, festgemacht (Dinger et al., 2008; Mercer et al., 2009). So werden lncRNAs auch als mRNA-gleiche Transkripte beschrieben, denen lediglich ein Protein-kodierender ORF fehlt (Pauli et al., 2011). Das online verfügbare Tool CPC (Coding Potential Calculator, <http://cpc.cbi.pku.edu.cn/>) ermöglicht eine ungefähre - wenn auch rein auf mathematischen Parametern basierende - Einschätzung über das Kodierungspotential von Nukleotidsequenzen. Dabei werden Eigenschaften wie Peptidlänge, Aminosäure-Zusammensetzung, Protein-Homologe und Sekundärstruktur miteinbezogen (Dinger et al., 2008). Die Analyse der *Tc-flipflop*-Sequenzen mittels dieses Tools ergab mit erhöhter Wahrscheinlichkeit die nicht-kodierende Eigenschaft dieser beiden Gene. Da jedoch die Homologie zu anderen Proteinen ein entscheidender Parameter dieser Analyse ist und der potentielle Orphan-Gen-Charakter völlig unbeachtet bleibt, ist eine solche computerbasierte Vorhersage nur bedingt aussagekräftig.

Das tatsächliche Potential zur Protein-Kodierung kann über den Nachweis der Expression im Gewebe selbst bestätigt werden (McLysaght & Hurst, 2016; Prabh & Rodelsperger, 2016). Die *in situ* Hybridisierung mittels RNA-Antisense-Sonden lieferte dazu eine positive ubiquitäre Expression für *Tc-flipflop1* und *Tc-flipflop2*. Vor allem die Blastodermstadien zeigten ein starkes Expressionssignal. Diese ubiquitäre, sehr früh beginnende Expression deutet auf eine entsprechend früh einsetzende Funktion der *flipflop*-Gene in der Embryogenese von *Tribolium* hin. Dies lässt sich durch Live-Imaging-Aufnahmen von *Tc-flipflop*<sup>RNAi</sup> Embryonen und den hohen Anteil leerer Eier in Kutikulapräparaten bestätigen. Während die Western-Blot-Analyse für die Flipflop-Proteine Banden der passenden Größen lieferte, konnten *flipflop*-Sequenzen über massenspektrometrische Proteinanalyse nicht identifiziert werden. Primär enthielt die vom Flipflop-Antikörper erkannte Gelbande Proteine mit Sequenzübereinstimmungen zu allgemeinen Lipiden, Vitellin-, aber auch Cytoskelett-Proteinen. Diese Proteine sind vor allem auch im Dotter zu finden. Schon der *whole-mount* Antikörpernachweis lieferte Signale im Dotter, welche wesentlich stärker waren als die der Embryonen selbst. So kam es möglicherweise zu unspezifischen Bindungen von Dotterproteinen, welche mögliche Flipflop-Signale überlagert haben könnten. Aufgrund seiner Funktion und der Kandidaten, die in dieser Arbeit in Bezug auf *Tc*-Flipflop identifiziert wurden, ist es denkbar, dass *Tc*-Flipflop eng mit Cytoskelett-Proteinen assoziiert ist. Es lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend klären, ob *Tc-flipflop1* und *Tc-flipflop2* Protein-kodierend sind, kann jedoch weiterhin als wahrscheinlich angenommen werden. Beide besitzen ORFs und konnten mittels Western Blot über ihre vorhergesagte Größe nachgewiesen werden. Ein aussagekräftigeres Bild könnte erzielt werden, wenn es gelänge, Dottergewebe von embryonalem Gewebe zu trennen, bevor der Proteinnachweis mittels Western Blot durchgeführt wird. Somit könnte eine Signalüberlagerung durch Dotterproteine vermieden werden.

Neue, bzw. Orphan-Gene weisen, wie *flipflop*, keinerlei Homologien zu anderen Genen in anderen Abstammungslinien auf. Dadurch ist es nicht möglich, solche Gene strukturell und funktionell über einen Vergleich zu anderen Organismen einzuordnen (Tautz & Domazet-Lošo, 2011). Bei Einbezug des Gesamt-Genoms ist der Anteil von Orphan-Genen mit 10 - 30 %, zumindest bei den Arthropoden, nicht unerheblich (Wissler et al., 2013). Allein im Falle von *Tribolium castaneum* liegt die Zahl der speziesspezifischen Orphan-Gene bei ca. 3.600-3.700 von insgesamt 16.645 Genen im Genom (Wissler et al., 2013). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden 30-35 % der ORFs Orphan-Genen zugeordnet. Hier wurde auch der Begriff des Orphan-Gens zum ersten Mal geprägt (Dujon, 1996; Neme & Tautz,

2014). Bei Vertebraten zeigt sich hingegen ein anderes Bild. Lediglich 1 % des Humangenoms weist fehlende Homologien zu Genen anderer Organismen auf, nur 0,4 % des Mausgenoms besitzt kein Homolog zum Menschen (Lander et al., 2001; Long et al., 2003; Mouse Genome Sequencing et al., 2002). Es ist bisher noch nicht geklärt, wie Orphan-Gene entstehen und es wurden noch nicht viele von ihnen funktionell untersucht, obwohl sie wahrscheinlich essentiell für die Entwicklung neuer Funktionen unter artspezifischem Selektionsdruck sind (Long et al., 2003).

*Tc-flipflop* erscheint hier als ein guter Kandidat, als bisher unbekanntes Gen mit einer bisher unbeachteten, aber sehr entscheidenden Funktion im Mehlkäfer *Tribolium*. Der Knockdown der *flipflop*-Gene zeigt neben eingestülpten Beinen auch eingestülpte Kopfanhänge und Rückenschlussdefekte. Die Spezifität der phänotypischen Ausprägungen konnten zwar mittels nicht-überlappender Fragmente für beide Gene bestätigt werden. Allerdings sind die NOF-spezifischen Unterschiede gravierend. Für die statistische Analyse in dieser Arbeit wurden sowohl für *Tc-flipflop1* als auch *Tc-flipflop2* die NOFs verwendet, welche in den 3'-Regionen der Gene lagen. Dies basierte auf der Tatsache, dass der Knockdown mittels dieser Fragmente durchgehend schwächere Defekte als die Fragmente der 5'-Bereiche verursachte und somit den Großteil analysierbarer Kutikulas lieferte. Ähnliche Effekte konnten in Knockdown Versuchen anderer Kandidatengene und in den Kontrollversuchen mittels *Tc-dll* RNAi gezeigt werden. Während einige Knockdown-Resultate von Kandidatengenen zum Teil nicht mittels nicht-überlappender Fragmente direkt reproduziert werden konnten, ergaben die verwendeten Fragmente für *Tc-dll* stark regionsspezifische Phänotypen. Wie es zu diesen starken NOF-spezifischen Varianzen kommt, ist nicht klar. RNAi beruht auf der Degradation von mRNA und hat somit eine Verminderung der Proteinmenge zur Folge. Dabei sollte es im Prinzip keine Rolle spielen, welcher Teil der Sequenz für den Knockdown verwendet wird, da eine nicht-intakte mRNA nicht in ein funktionales Protein translatiert werden kann. Einen Anhaltspunkt für das *Tc-dll* Gen liegt in der konservierten Sequenz. Das Fragment, dessen Knockdown den starken Phänotyp verursacht, liegt im für die Homeodomäne kodierenden Bereich des Gens. Hingegen liegen die NOF-Sequenzen, die zu einem schwächeren Phänotyp führen, in den nicht-translatierten Bereichen. Qualitativ zeigen die Experimente den gleichen genspezifischen Effekt verkürzter Extremitäten mit allen Fragmenten. Die Transformation der Antenne zum Bein wurde als schwacher *distalless*-Phänotyp bereits für *Drosophila* beschrieben (Panganiban, 2000).

Fragment-spezifische Penetranz-Unterschiede in RNAi Experimenten tauchen durchaus häufiger auf und wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gesehen (Horn & Panfilio, 2016). Diskutiert werden diese Effekte in der Regel jedoch nicht, da die Verwendung von NOFs letztlich dem alleinigen *proof-of-principle* dient. Dies sollte jedoch im Zuge weiterführender Experimente näher untersucht werden. Da in Knockdown Experimenten für die *Tc-flipflop* Gene die Fragmente des 5'-Bereiches in beiden Fällen hauptsächlich leere Eier zu sehen waren zeigt, dass die Degradation des 5'UTR-Bereiches die Proteinsynthese für dieses Gen effektiver verhindert. Es ist denkbar, dass durch den alleinigen Knockdown der 3'UTR die Proteinsynthese durch Vorhandensein der noch intakten Translations-regulierenden 5'UTR dennoch teilweise initiiert werden kann.

Grundsätzlich konnte der ursprünglich beobachtete *Tc-flipflop* Phänotyp mit allen NOFs reproduziert werden und es stellt sich die Frage, wie es zu solchen Invertierungsereignissen von Epithelien kommen kann und welche molekularen Mechanismen diesen zugrunde liegen.

### **4.2. Direktionalität und Zelltod in der Embryonalentwicklung**

Grundsätzlich basieren Prozesse wie das Auswachsen von Beinen und Kopfanhängen, der des Rückenschlusses und viele andere organbildende bzw. formgebende Prozesse, auf morphogenetischen Prozessen der Zellwanderung, Zellformveränderung und dem gerichteten Wachstum von Geweben (Walck-Shannon & Hardin, 2014).

Damit ein Gewebe in- bzw. evaginieren kann muss von einem limitierten Bereich des Epithels eine kontraktile Spannung aufgebaut werden. Somit geht der Invagination eine Konstriktion der apikalen, äußeren Seite der Zellen voraus. Ein evaginierendes Gewebe benötigt dementsprechend eine basale Konstriktion der Zellen in diesem Bereich (Lewis, 1947). Ein Epithelgewebe wird im weitesten Sinne als uniforme Anordnung individueller, adhärenter Zellen mit apikal-basaler Polarität beschrieben (Davidson, 2012; Kondo & Hayashi, 2015). Viele klassischen Invaginationsprozesse wie die Gastrulation, die Ventral-furchenbildung in *Drosophila*, oder röhrenbildende Ereignisse sind bereits gut untersucht und beschrieben worden (Conte et al., 2009; Jidigam et al., 2015; Kölsch et al., 2007; Martin et al., 2009; Spencer et al., 2015; Tada & Kai, 2009; Varner & Nelson, 2014; Varner & Taber, 2012). Auch die Bildung von Imaginalscheiben, wie sie *Drosophila* aufweist, geschieht durch Invagination. Die Definierung und Segmentierung solcher Beinanlagen ist in



mehreren Modellorganismen bereits sehr detailliert untersucht worden. Hingegen wird vermutet, dass die Evagination, die darauffolgende unidirektionale Elongation und dreidimensionale Formung von Beinanlagen komplexer und nur teilweise analog zu anderen morphogenetischen Prozessen ist (Hopyan et al., 2011). Für diese Arbeit stand ein sehr kleines, aber entscheidendes Zeitfenster der Beinentwicklung im Fokus: die primäre Signalgebung, welche in einem definierten Bereich die Entscheidung vorgibt, ein Epithel nach außen zu stülpen. Was genau eben diesen Prozess des Auswachsens des Beines im frühen Stadium verursacht, ist bisher nicht geklärt (Wyngaarden et al., 2010). Diskutiert werden unter anderem Mechanismen wie aktive Zellmigration, konvergente Extension, gerichtete Zellproliferation und räumlich begrenzte Apoptose (Hopyan et al., 2011).

Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose werden unter anderem von JNK/MAPK Signalwegen, z.B. in Zusammenhang mit Tumorbildung, beeinflusst, indem sie die intrazelluläre Signalantwort extrazellulärer Signale regulieren (Masliah-Planchon et al., 2016; Zhang & Liu, 2002). Um einen Anhaltspunkt darüber zu erhalten, ob MAPK-Signalwegskomponenten am Auswachsen von Körperanhängen eine Rolle spielen, wurde in dieser Arbeit ein MAPK-Antikörper verwendet. Dabei konnte jedoch weder für Wildtypen, noch für Embryonen, welche aus RNAi-Versuchen stammten, eine distinkte Expression in morphogenetisch aktiven Zonen festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Dass Zellproliferation natürlich in wachsenden Geweben stattfindet, jedoch in Bereichen stattfindender Morphogenese weder erhöht ist, noch aktiv zu gerichteter Formveränderung beiträgt, wurde bereits im Süßwasserpolyphen *Hydra*, als auch in Vertebraten wie Maus und Huhn gezeigt (Fernandez-Teran et al., 2006; Gros et al., 2010; Hornbruch & Wolpert, 1970; Philipp et al., 2009).

Das Durchlaufen von Zelltod ist ein wichtiger, weit verbreiteter Mechanismus in der Entwicklung mehrzelliger Organismen (Arya & White, 2015). Dabei gibt es durchaus mehrere Wege, die zum Zelltod führen können; wie beispielsweise Nekrose oder Autophagie. Der vorherrschende Mechanismus, um Zellen kontrolliert zu "entsorgen", ist jedoch der programmierte Zelltod (Apoptose) (Altman & Rathmell, 2012; Hochreiter-Hufford & Ravichandran, 2013; Savill, 1997). Die Involvierung von Apoptose wird bei einigen Prozessen als ein möglicher Faktor der epithelialen Morphogenese vermutet, wo Zelltod häufig in Regionen stattfindender Gewebeverformungsprozesse aufzutreten scheint (Saunders & Gasseling, 1962). Tatsächlich konnte während der Faltung pupaler Imaginalscheiben von

*Drosophila* gezeigt werden, dass apico-basale Aktomyosin-Kabel, welche Apoptose durchlaufen, die lokale Deformation eines Oberflächenepithels aktiv verursachen können (Kiehart, 2015; Monier et al., 2015). Myosin II ist mit Aktin, einem wichtigen Bestandteil des Cytoskeletts, verbunden und induziert eine erhöhte Zugspannung in der Oberfläche eines apikalen Epithels, wenn dort Epithelzellen Apoptose durchlaufen. Dadurch kommt es zu Spannungsänderungen und einer damit einhergehenden Umformung des Gewebes (Monier et al., 2015). Um der Frage nachzugehen, ob die *flipflop*-Gene möglicherweise das Zelltodverhalten von Epithelzellen beeinflussen, wurde ein Apoptose-Test mittels kreuzreagierendem *Drosophila* cleaved Dcp-1 Antikörper durchgeführt (Sarkissian et al., 2014). Über einen Nachweis der aktivierten Form der Effektor Caspase Dcp-1 kann indirekt der Nachweis auf Apoptose im Gewebe erbracht werden. In dieser Arbeit wurde der Nachweis von cleaved Dcp-1 in *whole mount* Embryonen des unbehandelten Wildtyps, UV-bestrahlter Wildtypen (**Abb. 16**), sowie *Tc-flipflop*- (**Abb. 15**) und *Tc-RhoGEF2*- (**Abb. 20**) RNAi-behandelter Embryonen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass gesundes Gewebe in der Regel weniger apoptotische Zellen aufweist, als UV-geschädigtes (**Abb. 16**). Sowohl im Wildtyp, als auch in RNAi-Embryonen waren Dcp-1 positive Signale median der Kopflappen und entlang der A-P Achse, also in Bereichen des Nervensystems, zu sehen. In *Drosophila* gilt die Ausbildung des Nervensystems als Modell für die Analyse der für Apoptose verantwortlichen Signalgebung, da diese Strukturen verstärkter Zellproliferation und Apoptose unterliegen (Pinto-Teixeira et al., 2016). Darüber hinaus konnte jedoch keine definierte Lokalisation auf bestimmte Geweberegionen in den Wildtypen ausgemacht werden. Für die RNAi-Embryonen bestand die Vermutung, dass durch ausbleibende, bzw. falsch lokalisierte Apoptose Zellformveränderungsprozesse gestört und somit die Direktionalität der Gewebemorphogenese verändert ist. Es wurde zwar ein teilweise minimal erhöhtes Level aktiver Caspase-Tätigkeit festgestellt, nicht jedoch in dem Maße, dass sich dadurch die spezifischen phänotypischen Ausprägungen erklären lassen. Auch hier schien die Lokalisation eher stochastisch im Gewebe verteilt und Apoptose eher eine Folge, statt die Ursache zu sein.

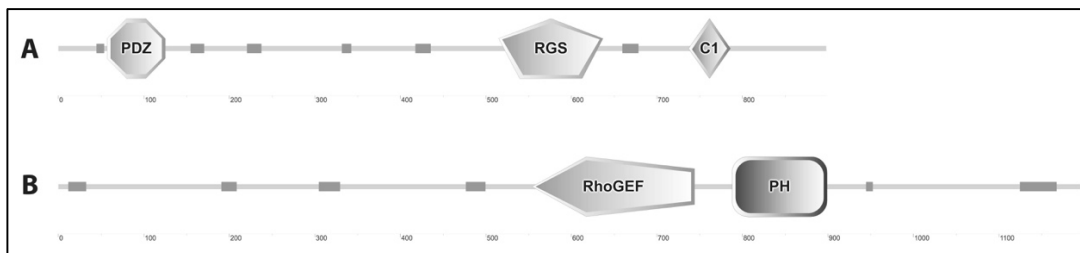
Dass programmierter Zelltod in der Formgebung bereits ausgebildeter Strukturen eine Rolle spielt, wie oben beschrieben, ist nicht neu. Dabei ist es jedoch von entscheidender Bedeutung, zwischen späterer Strukturgebung und primärer Entstehung der Form zu unterscheiden. Schon Jahre zuvor konnte gezeigt werden, dass Zelltod (hier noch nicht zwischen

Apoptose und Nekrose unterschieden) die Konturen der Flügelanlagen von Hühnern definiert (Saunders & Gasseling, 1962). In der Maus fand sich ein vergleichbares Bild. Hier konnten in späteren formgebenden Embryonalstadien erhöhte Apoptoselevel durch TUNEL-Assays festgestellt werden. Entscheidend ist dabei jedoch, dass in der früheren Embryogenese und somit bei der primären Entstehung der Beinanlagen dies nicht der Fall war (Fernandez-Teran et al., 2006). Eine aktive Funktion von programmiertem Zelltod wurde bisher in der primären Initiation von Gewebeverformung auch in keinem anderen Organismus nachgewiesen. Somit stellt Apoptose zwar einen Faktor in morphogenetischen Prozessen dar, kann aber mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht für die primäre "inside-out" versus "outside-in" Entscheidung verantwortlich gemacht werden. Dabei sei auch zu bedenken, dass Apoptose-Tests kein sehr genaues Bild von tatsächlich stattgefundenem Zelltod liefern können. Die Nachweisreaktionen mittels Anti-cleaved Dcp-1 Antikörper wurden in fixierten *Tribolium* RNAi-Embryonen durchgeführt und stellen somit nur eine Momentaufnahme dar. Gestorbene Zellen können jedoch schon innerhalb sehr kurzer Zeit (schon eine Stunde nach Initiation des Zelltods) phagozytiert und somit entfernt werden, sodass sie im Gewebe nicht mehr nachweisbar sind (Arya & White, 2015). Dies spiegelte sich auch in der Varianz unterschiedlich starker positiver Dcp-1-Signale zwischen gleich behandelten Embryonen *in situ* wider. Sowohl in unbehandelten und UV-bestrahlten Wildtypen, als auch in RNAi-Embryonen fanden sich Individuen mit stark Dcp-1 positiven, als auch sehr geringen Signalen. Insgesamt kann jedoch geschlussfolgert werden, dass Apoptose als funktionelle Kausalität für durch *Tc-flipflop* und *Tc-RhoGEF2* RNAi erzeugte Phänotypen ausgeschlossen werden kann.

### **4.3. *RhoGEF2* und *flipflop* sind essentiell für die Direktionalität epithelialer Morphogenese**

Der Orphan-Gen-Charakter von *Tc-flipflop* erschwert eine Einordnung in entsprechende, bekannte Signalwege. Daher war es wichtig, weitere Kandidaten zu finden, welche einen *flipflop*-ähnlichen RNAi Phänotyp aufweisen, evolutionär konserviert und nach Möglichkeit, zumindest in anderen Organismen, bereits charakterisiert sind. Ein solcher Kandidat ist *Tc-RhoGEF2*. Der parentale RNAi-Knockdown dieses Gens verursacht allgemein starke Defekte in der Embryonalentwicklung von *Tribolium*. Dabei konnte auch eine mit *Tc-flipflop* vergleichbare Funktion des Gens in der Direktionalität von Gewebewachstum festgestellt werden. Sowohl Kopf- als auch Thorax-Anhänge sind, soweit noch erkennbar, häufig inver-

tiert. RhoGEF2 ist ein hochkonservierter Guanine-Nucleotide Exchange Factor (GEF) welcher Proteine der Rho-GTPasen Familie reguliert (Barrett et al., 1997). GEFs sind durch mindestens eine konservierte Dbl homology (DH) Domäne, auch als RhoGEF-Domäne bezeichnet, und eine Pleckstrin homology (PH) Domäne gekennzeichnet. Darüber hinaus besitzen sie häufig weitere Motive, beispielsweise eine PDZ Domäne (post synaptic density protein, *Drosophila* disc large tumor suppressor (Dlg1) und zonula occludens-1 protein (zo-1)), wie sie *Tc-RhoGEF2* aufweist (Manser, 2005) (**Abb. 39**). Das *Tribolium* Homolog *Tc-RhoGEF2* war in einer früheren Genom-Version auf zwei unmittelbar nebeneinanderliegende Genmodelle *TC032343* und *TC003070* annotiert. Da die konservierten Domänen, welche ein kanonisches RhoGEF Protein ausmachen, auf beide Annotationen verteilt vorliegen, lag der Schluss nahe, dass es sich um ein einzelnes, zusammenhängendes Gen handelt. In dieser Arbeit konnte dies experimentell über eine PCR mittels übergreifender Primer bestätigt werden. Im neu annotierten *Tribolium*-Genom (au5 pred3 augustus prediction) sind die ursprünglichen Genmodelle zu einem Modell vereint (au5\_pred3.g2095), was das von mir ermittelte Genmodell bestätigt.



**Abb. 39 Konservierte Domänen der ursprünglichen *Tc-RhoGEF* Annotation.** (A) 5' Bereich (*TC032343*) der nebeneinanderliegenden Annotationen mit PDZ-Domäne. (B) 3' Bereich (*TC003070*) mit RhoGEF- und PH-Domäne. RGS Regulator of G protein signaling domain; C1 Protein kinase C conserved region 1 domain.

RhoGEF2 stellt einen essentiellen Faktor für die Aktivierung von Rho-GTPasen dar und bestimmt somit das Verhalten von Zellen und Geweben während einer Vielzahl morphogener Prozesse. Rho-GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 spielen eine entscheidende Rolle in Prozessen wie Aktin-Myosin II Bildung, Zell-Zell Adhäsion, Polarität, Zellmigration und -motilität (Kaibuchi et al., 1999; Nobes & Hall, 1994; Schlessinger et al., 2009). Entsprechend ihrer Funktionen sind sie membranassoziiert und agieren dort, je nach Funktion und beteiligter Signalmoleküle, in unterschiedlichen Signalkaskaden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Tc-RhoGEF2* während der gesamten Embryogenese von *Tribolium* ubiquitär exprimiert ist. In *Drosophila* wird *Dm-RhoGEF2* ebenfalls ubiquitär exprimiert und konnte dort vor allem in den apikalen Bereichen von Epithelzellen nachgewiesen werden (Kölsch et al., 2007; Padash Barmchi et al., 2005). Diese Lokalisation gibt einen Hinweis auf eine zentrale Rolle von RhoGEF2 in morphogenetischen Bewegungen. RhoGEF ist essentiell für Prozesse der Zellformveränderung, speziell durch Regulation von Actomyosin-Kontraktilität und die Initiierung apikaler Konstriktion (Barrett et al., 1997; Häcker & Perrimon, 1998; Padash Barmchi et al., 2005). In *Drosophila* wurde gezeigt, dass RhoGEF2 Mutanten keine Ventralfurche bilden, da die apikale Konstriktion inhibiert ist. Einige Zellen ziehen sich zwar unorganisiert zusammen, andere weiten sich jedoch apikal aus und invaginieren nicht. Außerdem entwickeln Embryonen homozygoter *RhoGEF2* Mutanten Kutikulas mit ventralen Öffnungen als Resultat tiefer Furchenbildung (Häcker & Perrimon, 1998).

Zellformveränderungen wie die In- bzw. Evagination von Zellgruppen sind in hohem Maße von der Oberflächenspannung im Gewebe abhängig, welche neben der Kontraktionsfähigkeit der Zelle auch vom Bindungs-Abbau und Wiederaufbau zwischen Actomyosin und Adherens Junctions bestimmt wird (Kölsch et al., 2007; Lecuit & Lenne, 2007). Somit kann die zentrale Rolle, die RhoGEF2 sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten bereits zugeordnet werden konnte, durch die in dieser Arbeit gezeigten Knockdown-Resultate erklären. Die Dysfunktion der Direktionalität von Zellwanderung geht konform mit *Tc-RhoGEF2* RNAi Phänotypen, bei denen bereits der Embryo nicht normal von anterior nach posterior elongiert, sondern stattdessen dorsal-posterior orientiert ist und im Dotter S-förmig vorliegt. Von diesen Zellwanderungsdefekten betroffen sind auch die extraembryonalen Membranen, wodurch es zu einigen weiteren, sehr prominenten Effekten kommt. So falten sich die extraembryonalen Membranen nicht, wie im Wildtyp, nach ventral über den Embryo, sondern ziehen sich stattdessen teilweise nach dorsal (**Abb. 21**), wobei eine Konstriktion an der Gewebegrenze von Amnion und Serosa entsteht. Dieser Effekt ist in fixierten *Tc-flipflop* RNAi Embryonen ebenfalls zu beobachten (**Abb. 20B**). Dies könnte auf eine Umorientierung der Direktionalität im Faltungsprozess durch eine falsche, bzw. nicht stattfindende Signalgebung zur lokalen Zellformveränderung am posterioren Ende des Embryos hindeuten. In der Folge führt dies auch zur Evertierung des Hinterdarms, wie es sowohl für *Tc-ff*, als auch *Tc-RhoGEF2* auf embryonaler und larvaler Ebene zu sehen ist. Dieser Phänotyp umgekehrter Umstülpung geht konform mit denen eingestülpter Extremitäten nach *Tc-flipflop* und *Tc-*

*RhoGEF2* Knockdown. Darüber hinaus konnte in Live-Imaging-Aufnahmen ein weiterer RNAi Effekt auf die extraembryonalen Membranen beobachtet werden: die Ruptur von Amnion und Serosa während der Keimstreifenentwicklung. Demzufolge wurde embryonales Gewebe nach lateral auseinandergerissen und es entwickelten sich Keimstreifen mit einem Loch im medianen Bereich entlang der A-P-Achse. Eine derartige Beeinträchtigung der mechanischen Spannungsverhältnisse in den extraembryonalen Geweben erklären ebenso den hohen Anteil der Fälle, in denen es zu einem unvollständig ausgeführten Dorsalschluss der Larven kam. Auch dieser Defekt wurde in *Tc-flipflop*<sup>RNAi</sup> Kutikulas beobachtet. Der Dorsalschluss ist bereits intensiv in Modellorganismen wie *Drosophila* untersucht worden, da er allgemein als gutes Modell für die Regulation epithelialer Morphogenese gilt, aber nur langsam in seiner Komplexität verstanden wird (Harden, 2002; Jacinto & Martin, 2001; Knust, 1996). Der Prozess zeichnet sich vor allem durch die Verbreitung von Gewebeplatten aus und wird daher auch mit Wundheilungsprozessen verglichen (Kiehart, 1999; Kiehart et al., 2000; Martin & Lewis, 1992). Der Dorsalschluss setzt ein gerichtetes Migrationsverhalten der lateralen Epidermis von beiden Seiten des Embryos voraus, sodass diese auf der dorsalen Seite aufeinandertreffen und verschmelzen können (Harden, 2002). Dabei kommt es zu einer Akkumulation von Myosin-II und F-Aktin an den Vorderkanten (LE, *leading edge cells*) der sich nach dorsal bewegenden, kontrahierenden Epidermiszellen (Mizuno et al., 2002; Young et al., 1993). Für diese Aktomyosin-Regulation und die entstehende Zellkontraktilität sind Rho-GTPasen und deren Regulator RhoGEF2 maßgeblich verantwortlich (Häcker & Perrimon, 1998; Padash Barmchi et al., 2005; Schlessinger et al., 2009). Während die Elongation dieser LE-Zellen auf ihrer Konstriktion von anterior nach posterior basiert, migrieren die übrigen lateralen Zellen eher passiv-mechanisch (Harden, 2002). Dies schließt eine Involvierung mechanischen Drucks umliegender Zellen auf LE-Zellen aus und bedeutet, dass der Knockdown von *RhoGEF2* ausreicht, um den Abschluss des Dorsalschlusses zu verhindern, was auch für *Tribolium* in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. In schwächeren Ausprägungen dieser Verschiebung von Gewebespannung in den extraembryonalen Geweben zeigte sich in den hier durchgeführten Experimenten ein vergrößertes, ungeschlossenes Serosafenster junger fixierter *Tc-ff*<sup>RNAi</sup> Keimstreifen (**Abb. 24**).

Ein Unterschied zwischen *Tc-ff*<sup>RNAi</sup> und *Tc-RhoGEF2*<sup>RNAi</sup> Experimenten bestand in der Häufigkeit des Auftretens leerer Eier. Während der Anteil leerer Eier beim Knockdown von *Tc-RhoGEF2* ca. 6 % ausmachte, waren es in *Tc-ff*RNAi Experimenten je nach Verwendung des dsRNA Fragments bis über 90 %. Dieser Befund könnte damit erklärt werden, dass *Tc-*

*ff* schon sehr früh, während der ersten Zellteilungen in der Embryogenese, eine direktionale Funktion für die Zellbewegung übernimmt. Darauf weisen die frühe Expression von *Tc-ff*, als auch das frühe Zellverhalten, welches in Lebendaufnahmen von Knockdown-Individuen beobachtet wurde, hin. Noch vor Differenzierung von Amnion und Serosa ist ein ungerichtetes, scheinbar willkürliches Zellwanderungsverhalten zu verzeichnen, welches vermutlich die korrekte Bildung eines Keimstreifens verhindert. Da die Differenzierung der Zellen selbst nicht beeinflusst wird, können dennoch Amnion- und Serosa-spezifische Gewebe entstehen. Die Beeinflussung der direktionalen Bewegung dieser Gewebe bewirkt jedoch, dass sich embryonales Gewebe möglicherweise komplett umstülpt und an der Außenseite extra-embryonaler Gewebe akkumuliert. Dies führt letztlich zum Absterben der Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese und resultiert in einem erhöhten Maß an Apoptose im Blastodermstadium (**Abb. 15**). Da die Entwicklung der Embryogenese in diesen Fällen schon sehr früh gestört ist, kommt es auf Kutikulaebene zu leeren Eiern. Für *RhoGEF2* ist hingegen keine Funktion für Zellwanderung und Zellformveränderung in frühen, noch undifferenzierten Geweben in der Literatur beschrieben. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivität von *Tc-RhoGEF2* später einsetzt, als die von *Tc-ff*, was erklären würde, warum der Großteil der Knockdown-Individuen das Larvenstadium noch erreicht. Dennoch ist *Tc-RhoGEF2* so essentiell für die korrekte Formgebung von Geweben, dass gebildete Kutikulas oftmals wesentlich stärker deformiert sind, als *Tc-ff* Knockdown-Phänotypen.

Die Tatsache, dass sowohl *Tc-ff*, als auch *Tc-RhoGEF2* ubiquitär exprimiert sind, bedeutet, dass es sich bei beiden Genen um Faktoren handelt, die in einer Vielzahl von Geweben benötigt werden. Welche anderen Faktoren sie dabei regulieren, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, da Markergenanalysen mit gewebsspezifisch exprimierten Kandidaten keine Veränderung ihrer Expressionen lieferten (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnten jedoch weitere, ebenfalls ubiquitär exprimierte Gene identifiziert werden, welche ähnliche Funktionen aufweisen wie *Tc-ff* und *Tc-RhoGEF2* und somit eine funktionelle Einordnung der *Tc-flipflop* Gene ermöglichen.

#### 4.4. Rho-assoziierte Kandidaten

Dem Gen *Tc-RhoGEF2* konnte in dieser Arbeit eine zentrale Rolle für morphogenetische Prozesse in der Embryonalentwicklung von *Tribolium* zugeordnet werden. Daher lag es nahe, zunächst weitere Kandidaten zu analysieren, welche Sequenzähnlichkeiten mit *RhoGEF2* aufweisen, bzw. in der Literatur mit Rho-assoziierten Signalkaskaden in anderen Organismen beschrieben sind. Der überwiegende Teil der Knockdown Versuche solcher Gene

blieb jedoch ohne Ergebnis und wies hauptsächlich wildtypische Nachkommen ohne Defekte auf. Dies galt nicht für die *Drosophila* Homologe *Tc-RhoGEF64C* und *Tc-RhoGEF 18*, welche aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu *Tc-RhoGEF2* ausgewählt wurden. *Tc-RhoGEF64C* weist sowohl eine RhoGEF-, als auch eine PH-Domäne auf, durch welche das Gen eindeutig der GEF-Familie zugeordnet werden kann. Für das *Drosophila* Homolog wurde eine Funktion für die Bildung des Nervensystems, speziell der Direktionalität von Axonen (*Axon guidance*) beschrieben (Bashaw et al., 2001). Der parentale Knockdown von *Tc-RhoGEF64C* hatte jedoch bereits Auswirkungen auf die injizierten Tiere. Diese legten so gut wie keine Eier, deren phänotypische Ausprägung in Kutikularesten und leeren Eiern bestand. Auch die embryonale RNAi ließ keine funktionelle Auswertung zu, zeigt jedoch, dass dieses Gen essentiell für die Entwicklung von *Tribolium* ist. Die starken RNAi-induzierten Defekte, welche so auch in *Tc-ff* RNAi zu verzeichnen sind, schließen eine Involvierung in ähnliche Signalwege jedoch nicht aus.

Der parentale Knockdown von *Tc-RhoGEF 18*, welches ebenfalls RhoGEF- und PH-Domäne aufweist, ergab ein Alles-oder-nichts-Ergebnis. Die wenigen nicht geschlüpften Nachkommen zeigten Kutikulareste, leere Eier und "inside-out" Phänotypen. Letzteres ist ein D-V-Defekt, bei dem die Kutikula komplett von innen nach außen gestülpt ist. So konnten *Tc-ff*-assoziierte Phänotypen mittels *GEF 18* und *GEF64C* zwar nicht reproduziert werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Gene in gleichen Signalkaskaden agieren. Die Vielzahl an *GEF*-Genen im Genom deutet auf eine entsprechende Varianz und mögliche Redundanz der Funktionen, sodass der Ausfall einer Komponente von anderen kompensiert werden kann und deshalb in den Einzel-RNAi Versuchen hier keinen Phänotyp ergaben.

Das RhoGEF *Tc-Trio* wies in einigen Knockdown-Individuen, zwar nicht an Thorax- oder Kopfanhängen, aber am Abdomen Invertierungsdefekte auf. Dies geht konform mit *Tc-ff* RNAi, in welcher der gleiche Phänotyp in bis zu 20 % der analysierten Kutikulas ebenfalls auftritt. *Tc-Trio* kodiert für ein Protein, welches sowohl RhoGEF- und PH-Domäne, als auch mehrere Spektrin-Domänen aufweist. Spektrin ist Bestandteil der Cytoskelettstruktur und bindet unter anderem an Aktin (Zhang & Rasband, 2016). Für Trio selbst wurde gezeigt, dass es spezifisch an eine Transmembran-Tyrosinphosphatase bindet (Debant et al., 1996). Das *Drosophila* Homolog *Dm-Trio* wird Rho-assoziierten Signalkaskaden und Funktionen in der Direktionalität von Axonen, als auch der Zellmigration zugeordnet (Lanier & Gertler, 2000) und passt somit prinzipiell gut in das funktionelle Schema mit *Tc-flipflop* und *Tc-RhoGEF2*.



Aufgrund der RNAi Ergebnisse mit weiteren *Tribolium* GEF-Kandidaten kann vermutet werden, dass *Tc-flipflop* in Rho-assoziierten Signalwegen agiert. In anderen Organismen sind Faktoren wie Trio oder RhoGEF64C häufig neuronalen Cytoskelettfunktionen zugeordnet. Dies bedeutet, dass ähnliche Proteine nicht zwangsläufig in identischen Prozessen agieren, sondern diverse gewebsspezifische Funktionen besitzen. Dennoch sind Prozesse welche Zellformveränderung und apikale Konstriktion benötigen, beispielsweise bei der Morphogenese des Vertebraten-Nervensystems beteiligt (Kiehart et al., 2000). So werden vielen in dieser Arbeit untersuchten Kandidaten mit directionalen Knockdown-Defekten in der Literatur auch Nervensystem-spezifische Funktionen zugeordnet (Backer et al., 2007; Bashaw et al., 2001; Kaufmann et al., 1998; Lanier & Gertler, 2000; Luo et al., 1997).

### **4.5. Direktionalität im nichtkanonischen Wnt-Signalweg**

Wnt-Signaltransduktion ist ein essentieller "Masterregulator" bei einer großen Vielzahl von Entwicklungsprozessen (Cadigan & Peifer, 2009; Gómez-Orte et al., 2013; Nusse, 2012; van Amerongen & Nusse, 2009). Dabei werden kanonische ( $\beta$ -Catenin-abhängige) und nichtkanonische ( $\beta$ -Catenin-unabhängige) Signalkaskaden unterschieden. Während der kanonische Wnt-Signalweg schon detailliert beschrieben wurde, ist die Funktionsweise nichtkanonischer Kaskaden bisher weniger gut verstanden (Gómez-Orte et al., 2013; Nusse, 2012; Schlessinger et al., 2009). Ein häufig genannter Prozess, welcher mit dem nichtkanonischen Wnt-Signalweg assoziiert wird, ist die Planare Zellpolarität (PCP, *planar cell polarity*). Diese beschreibt jede Art der Manifestation von Polarität einer zweidimensionalen (Ober)fläche (Goodrich & Strutt, 2011), was jedoch die apiko-basale Achse des Gewebes vernachlässigt. Somit wurde PCP zunächst vorrangig für die directionale Ausrichtung kutikulärer Strukturen an einzelnen Zellen und Zellverbänden beschrieben (Goodrich & Strutt, 2011; Nübler-Jung, 1987). Nichtkanonische Signaltransduktion ist jedoch an einer Reihe komplexer morphogenetischer Prozesse beteiligt, welche sich letztlich auch im PCP widerspiegeln. Dies beinhaltet Prozesse wie die (Re)organisation des Cytoskeletts, Zellmigration und -polarität, sowie Adhäsion und Konvergente Extension (CE, *convergent extension*) (Green et al., 2014; Schlessinger et al., 2009; Tada & Kai, 2009). Dabei gilt Wnt5(a) als Hauptinitiator nichtkanonischer Wnt-Kaskaden. Als Rezeptoren wurden neben den gut untersuchten Frizzled-Rezeptoren vor allem Transmembran-Rezeptor Tyrosinkinasen (RTKs) wie Ror, Ryk und Ptk7 (Dm-otk) identifiziert, welche wiederum upstream von Rho-assoziierten Signalkaskaden, inklusive RhoGEF2 agieren (Green et al., 2014; Niehrs, 2012;

Schlessinger et al., 2009). RTKs sind Transmembranproteine, die intrazelluläre, Ligandenkontrollierte Kinaseaktivität besitzen (Gentile et al., 2011). Aufgrund dieser Einordnung und ihrer oben genannten Funktionen wurden nichtkanonische Wnt-Faktoren auch in dieser Arbeit untersucht. Dies beinhaltete die Orthologe *Tc-ror1*, *Tc-ror2* (*Dm-nrk*), *Tc-ptk7*, *Tc-ryk*, *Tc-dsh* und den Liganden *Tc-Wnt5*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die *Tc-ror* Gene analysiert. Der Knockdown von *Tc-ror2* führte zu A-P-Defekten durch fehlende Kopf- bzw. Kopf- und Thoraxsegmente. Dennoch machten geschlüpfte wildtypische Larven den Großteil aus, was eine gewisse Redundanz vermuten lässt. Der *Tc-ror1* Knockdown hingegen zeigte Abdominaldefekte und zu 49 % Invertierungen der Kopfanhänge, wie sie mit *Tc-ff* RNAi Phänotypen vergleichbar sind. Beide *Tc-ror* Gene wiesen darüber hinaus Rückenschlussdefekte und leere Eier auf. Ror beeinflusst, wie auch Ryk, morphogenetische Prozesse, welche die polarisierte Migration von Zellen beinhalten. Ror1 und Ror2 sind evolutionär hoch konserviert, ihre Funktionen scheinen jedoch zwischen Vertebraten und Invertebraten zu variieren. So sind für die *Drosophila* Homologe *Dm-ror* und *Dm-nrk*, als auch das einzige Homolog in *Caenorhabditis elegans* CAM-1 (Calmodulin-1) Expressionsmuster in den Nervensystemen beschrieben. Während für *Drosophila* keine Funktionen beschrieben sind, ist CAM-1 für die Migration von Nervenzellen, als auch die Polarität von Epithel- und Stammzellen verantwortlich (Forrester et al., 1999; Wilson et al., 1993; Zinovyeva et al., 2008). In *Xenopus* wurde Ror2 als Regulator polarisierter Zellmigration (*convergent extension*) identifiziert, während für Ror2 in Knockout-Mäusen unter anderem kurze Beine, sowie eine veränderte PCP-assoziierte Orientierung der Haarzellen des Innenohrs beschrieben wurden (Hikasa et al., 2002; Takeuchi et al., 2000). Über die Funktion von Ror1 ist jedoch weniger bekannt. In Zellkultur wurde dem Gen eine onkogene Wirkung zugeordnet, Knockout-Mäuse zeigen nur schwache Defekte im Vergleich zu Ror2 (Gentile et al., 2011; Green et al., 2014).

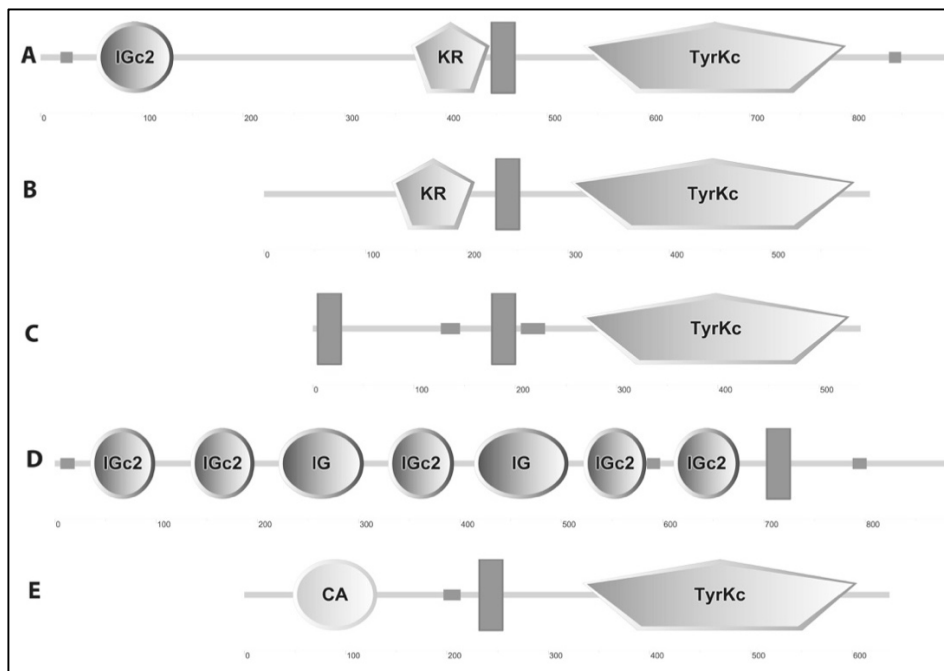
Das Gen *dishevelled* gilt auch im nichtkanonischen Wnt/PCP-Signalweg als wichtiger Mediator von Wnt-Signalen der Zelloberfläche zu downstream-Targets (Boutros et al., 1998; Cadigan & Nusse, 1997; Philipp et al., 2009) und wurde daher auch als Kandidatengen in dieser Arbeit untersucht. RNAi Versuche mit *Tc-dsh* hatten das Absterben injizierter Weibchen zur Folge, oder resultierten in leeren Eiern. *Tc-Dsh* weist unter anderem Domänen auf, welche auch für GTPasen und RhoGEFs charakteristisch sind. Dazu gehört neben einer PDZ-Domäne auch eine Pleckstrin-haltige (Vgl. Pleckstrin-homology domain in RhoGEF2)

DEP-Domäne (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin). Es wird angenommen, dass PH Domänen für die Assoziation von Proteinen an der Zellmembran verantwortlich sind, da sie spezifisch an Phosphatidylinositol (Bestandteile der Zellmembran) binden (Häcker & Perrimon, 1998; Wong et al., 2000; Zheng et al., 1996) und mit G-Proteinen interagieren (Cadigan & Nusse, 1997). Die starken Effekte des *Tc-dsh* Knockdowns zeigen, wie essentiell das Gen nicht nur für die Embryonalentwicklung, sondern auch die adulten Tiere für *Tribolium* ist. Aufgrund der frühen RNAi-vermittelten Inhibition der Entwicklung waren morphologische Untersuchungen der Nachkommen nicht möglich und lassen keine Rückschlüsse auf involvierte Prozesse zu. Die Beteiligung von *Tc-dsh* an direktionalen Entscheidungen während der Morphogenese kann somit jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Der Knockdown des Liganden *Tc-Wnt5*, als auch der Orthologe *Tc-ptk7* und *Tc-ryk*, erbrachten keine Resultate. Wnt5(A) gilt, wie bereits erwähnt, als Hauptligand nichtkanonischer Signalwege. Dass *Tc-Wnt5* RNAi keinen Effekt im Mehlkäfer *Tribolium* hat, deckt sich mit bereits bestehenden Analysen im Labor und von anderen Arbeitsgruppen. Insgesamt wurden neun Wnt-Gene in *Tribolium* identifiziert, welche spezifisch und teilweise einander überlappend exprimiert sind, deren Knockdown zum Teil in Defekten der Achsenverlängerung resultierte (Bolognesi et al., 2008a; Bolognesi et al., 2008b). Darüber hinaus ist auch nicht geklärt, welche Rezeptoren diese Liganden jeweils binden und inwiefern sie redundant sind. Dass sich Invertierungs-Phänotypen von *Tc-ror1* mittels *Tc-Wnt5*-Knockdown nicht erzeugen ließen lässt vermuten, dass die Initiierung der Direktionalität von auswachsenden Geweben über eine Wnt5-unabhängige Signalkaskade geschieht. In Zellkultur wurde Wnt5 bereits als Ligand für Ror2 identifiziert. Jedoch ist der Ligand für Ror1 noch unbekannt (Gentile et al., 2011; Mikels & Nusse, 2006; Nomachi et al., 2008).

Die RTK Gene *Tc-ptk7* und *Tc-ryk*, welche ebenfalls keine Defekte nach dem Knockdown zeigten, weisen hohe Sequenzähnlichkeiten, sowohl untereinander, als auch zu anderen RTK-verwandten Genen auf. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Ausfall eines der Gene durch andere kompensiert werden kann, ist somit sehr hoch. Des Weiteren gibt es Unterschiede in der molekularen Struktur im Vergleich zu den *Tc-Ror* Proteinen. *Tc-Ror1* und *Tc-Ror2* besitzen neben der Tyrosinkinase Domäne zusätzlich eine Kringle Domäne, welche in den übrigen hier untersuchten RTKs fehlt (**Abb. 40**). Darüber hinaus ist fraglich, inwiefern die Tyrosinkinase Domäne entscheidend für *Tc-Flipflop*-assoziierte direktionale Morphogenese-Ereignisse ist. Ror1, welches als einziger RTK-Kandidat Invertierungen nach dem

Knockdown zeigt, wird auch als Pseudokinase bezeichnet, da es trotz Vorhandensein der Domäne keine Tyrosinkinase Aktivität aufweist (Gentile et al., 2011). Somit besteht die Vermutung, dass noch andere Eigenschaften dieser Transmembranproteine für die Direktionalitätsentscheidung verantwortlich sind. So besitzt *Tc-Ror1*, anders als *Tc-Ror2*, zusätzlich eine Immunoglobulin-2 (IGc2) Domäne (**Abb. 40**). Immunoglobuline stellen eine der charakterisierenden Transmembran Glycoprotein-Familien dar, welche Zell-Zell Interaktionen und Zelladhäsionsprozesse gewährleisten und sind häufig mit Tyrosinkinase Domänen assoziiert (Gumbiner, 1996; Hynes & Zhao, 2000).



**Abb. 40** Konservierte Domänen der analysierten RTK-Kandidaten. (A) *Tc-Ror1* (B) *Tc-Ror2* (C) *Tc-Ryk* (D) *Tc-Ptk7* (E) *Tc-Cad96Ca*. Quadrate sind Transmembrandomänen. CA Cadherin repeats ; IGc2 Immunoglobulin C-2 type domain; KR Kringle domain ; TyrKc Tyrosine kinase domain.

Über die Sequenzähnlichkeit zu *Tc-ryk* wurde darüber hinaus das Gen *Tc-Cad96Ca* (*Cadherin96Ca*, auch *Dm-stitcher*) identifiziert und funktionell analysiert. Der Knockdown des Gens wies, neben weiteren Defekten, eindeutige Übereinstimmungen mit *Tc-flipflop* RNAi Phänotypen auf. Das Resultat bestand zu einem Großteil in leeren Eiern, welche fast 50 % ausmachten. Darüber hinaus zeigte fast die Hälfte analysierter Kutikulas einen unvollständigen Rückenschluss. Der distinkte Invertierungsphänotyp, vor allem der Mundwerkzeuge und des Abdomens, war zu 9,2 % zu verzeichnen. Dies müsste jedoch mit nichtüberlappenden Fragmenten bestätigt werden. *Cad96Ca* stellt, wie die anderen hier untersuchten nicht-kanonischen Wnt-Kandidaten, eine Rezeptor Tyrosinkinase dar. *Tc-Cad96Ca* weist sowohl eine Tyrosinkinase-, als auch eine Cadherin-Domäne auf. Als Cadherin ist es verwandt mit

bekannten PCP-Komponenten wie Fat, Dachous und Flamingo (Hynes & Zhao, 2000). Cadherine sind Zelladhäsionsmoleküle welche an vielen Prozessen der Morphogenese beteiligt sind. Diese weisen untereinander durchaus Varianzen in der Proteinstruktur auf, was auf die Vielfalt der Prozesse, an denen sie beteiligt sind, hinweist (Takeichi, 1995). In Zellkultur sind sie wichtige Mediatoren von kollektiver Zellmigration (CCM, *collective cell migration*), indem sie mechanische Kräfte zwischen Cytoskelett und Plasmamembran vermitteln (Borghi et al., 2010; Ladoux et al., 2010; Plutoni et al., 2016). Für die Cadherin-assoziierte CCM spielen wiederum Rho GTPasen eine entscheidende Rolle, wobei die Art der Cadherin-Rho-vermittelten Interaktion noch nicht aufgeklärt ist (Plutoni et al., 2016). Cad96Ca selbst wurde bereits eine Funktion bei Wundheilungsprozessen in *Drosophila* zugeordnet, indem es den Aufbau von Aktin fördert (Wang et al., 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen Wnt/Rho-assoziierte Tyrosinkinasen zu guten Kandidaten für die Direktionalität in der Morphogenese und stützen, auf Grundlage bekannter Funktionen dieser evolutionär hoch konservierten Kandidaten, die Einordnung von *Tc-flipflop* in Prozesse der Cytoskelett-Dynamik und Zellformveränderung (**Abb. 41**). Wo genau *Tc-flipflop1* und *Tc-flipflop2* eingeordnet werden können und mit welchen Komponenten sie direkt interagieren, bleibt weiterhin zu klären.

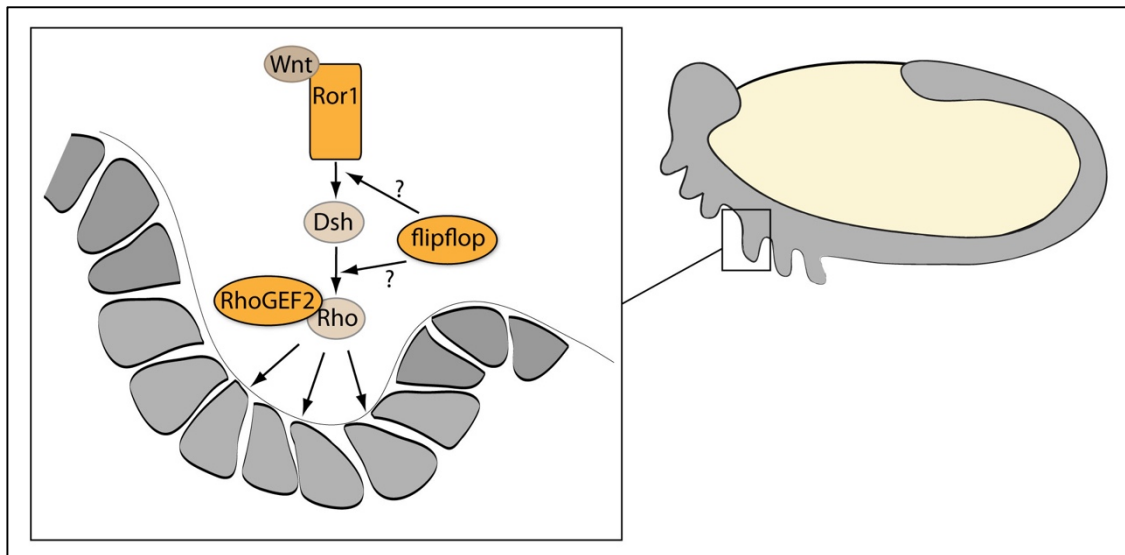


Abb. 41 Mögliche Einordnung von *Tc-flipflop* in eine Ror/Rho-Signalkaskade.

#### 4.6. Die Transkriptionsfaktoren ZFX und DEAF-1

In dieser Arbeit wurden, basierend auf RNAi Phänotypen des iBeetle-Screens auch Gene analysiert, deren Einordnung in spezifische Signalwege der Morphogenese nicht offensichtlich ist. Dazu gehörten die Gene *Tc-DEAF-1* und das Zinkfinger-kodierende Gen *Tc-zfx*.

*Tc-DEAF-1* wurde aufgrund seines RNAi Phänotyps im iBeetle-Screen identifiziert und konnte hier repliziert werden. Der Knockdown des Gens führt zu invertierten Abdomen und teilweise deformierten Beinen. Der Phänotyp invertierter Abdomen trat auch in *Tc-flipflop* RNAi zwischen 15 % bis 19 % auf. DEAF-1 ist ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor, welcher ursprünglich nach seiner Bindeeigenschaft an das Hox-Gen *Deformed (Dfd)* benannt ist (Gross & McGinnis, 1996; Veraksa et al., 2002). In DEAF-1 wurde die charakteristische DNA-bindende SAND- (SP100, AIRE-1, NucP41/75 und DEAF-1) und eine MYND- (myeloid, Nervy, und DEAF-1) Proteindomäne beschrieben. Die Analyse des *Tribolium* Homologs zeigt hingegen zwar das Vorhandensein der SAND- nicht aber der MYND-Domäne. In *Drosophila* führt die Mutation des Gens zum frühen Defekt der Embryogenese, während die Überexpression durch Migrationsdefekte der dorsalen Epidermis und daraus folgenden Defekten des Dorsalschlusses gekennzeichnet ist (Veraksa et al., 2002). Darüber hinaus ist abgesehen von Domänen-spezifischen Bindeeigenschaften wenig über DEAF-1 bekannt. Das macht es schwierig, *Tc-DEAF-1* funktionell einzuordnen.

Die Analyse des *Tc-zfx* Gens (zinc finger protein, X-linked) basierte ebenfalls RNAi-Phänotypen des iBeetle-Screens. Obwohl der Knockdown auf den überwiegenden Teil der Nachkommen keinen Einfluss hatte, konnten neben deformierten Beinen Invertierungsergebnisse sowohl an Kopfanhängen als auch an Beinen festgestellt werden. Zfx ist ein Cys2His2- (C2H2) Zinkfinger Transkriptionsfaktor, gekennzeichnet durch seine Zinkfinger-Repeat-Domänen. C2H2 Zinkfinger sind in der Regel DNA-bindende Transkriptions-Repressoren, können jedoch auch RNA binden (Razin et al., 2012). Zinkfinger sind hoch konserviert und als vielzählige Homologe auch in *Tribolium* vorhanden. Funktionell sind diese oft nur marginal analysiert. Die entsprechende Redundanz dieser Gene spiegelte sich in den mehrfachen Einzel- und Doppel-Knockdowns mehrerer sequenzähnlichen Kandidaten wider. Es gibt nur wenige, hauptsächlich Karzinomzell-basierte Untersuchungen des *Zfx* Gens. Knockdown-Experimente in humanen Zelllinien zeigten eine Verringerung der Zellproliferation und einen Anstieg von Apoptose, weshalb dem Gen onkogene Eigenschaften zugeordnet werden (Fang et al., 2012; Zhu et al., 2013).

Sowohl *Tc-DEAF-1*, als auch *Tc-zfx* sind basierend auf vorhandenen Daten schwer in spezifische Signalwege einzuordnen. Dass die konservierten Domänen von DEAF-1 vor allem nach eben diesem Protein benannt wurden, macht deutlich, dass diese sehr spezifisch sind. Umso verwunderlicher ist es, dass die Zinkfinger-bindende MYND-Domäne in *Tribolium* zu fehlen scheint. Es ist jedoch möglich, dass die Annotation des Gens unvollständig ist. Das Gen *Tc-zfx* bildet das andere Extrem. Zinkfinger-motive sind weitverbreitet und bilden eine Vielzahl verschiedener DNA-bindender Faktoren. Dennoch ist es denkbar, dass diese beiden Gene, aufgrund ihrer Invertierungsphänotypen, in ähnlichen Signalwegen agieren wie *Tc-flipflop*.

### 4.7. Cholindehydrogenase *Tc-cdh*

Der Knockdown des Gens *Tc-cdh* lieferte mit 89 % der ausgewerteten Kutikulas die meisten Invertierungsereignisse im Vergleich zu allen in dieser Arbeit untersuchten Genen. Die RNAi-Phänotypen gleichen dem markanten *Tc-flipflop* Syndrom: Invertierungen der Beine, Kopfanhänge und des Abdomens, als auch Defekte im Dorsalschluss und leere Eier. Es bleibt jedoch zu klären, warum die Knockdown Phänotypen für *Tc-cdh* nicht mittels NOFs reproduziert werden konnten. Ein Indiz könnte die große Vielzahl an Genen im *Tribolium* Genom sein, die für ähnliche Proteine kodieren und somit redundant sein könnten. Analysiert man die Proteinsequenzen des ursprünglichen Knockdown Fragments und die der übrigen Sequenz unabhängig voneinander mittels NCBI's Conserved Domains Tool, so erhält man kein Resultat für die NOF-Region. Die Analyse für das ursprüngliche Fragment, welches die starken Phänotypen erzeugt, deutet hingegen auf eine Domäne mit Oxidoreduktase-Aktivität und stellt somit vermutlich die enzymatisch entscheidende Region des Proteins dar. Somit ist es denkbar, dass die *Tc-flipflop*-ähnlichen Phänotypen mittels *Tc-cdh* Knockdown durch off-target Effekte auf mehrere Dehydrogenase-kodierende Gene zustande kamen. Die eventuell vorliegende redundante Funktion der Dehydrogenase Gene kann mit weiteren Doppel-RNAi Experimenten von NOFs dieser Gene untersucht werden.

Im Allgemeinen sind Cholindehydrogenasen (Cdh) Enzyme welche die Oxidation von Cholin zu Glycin-Betain katalysieren und verantwortlich für die Biosynthese von Membran-Phospholipiden (Phosphatidylcholine), Lipoproteinen und dem Neurotransmitter Acetylcholin sind. Darüber hinaus können sie über unterschiedliche Signalwege Genexpressionen epigenetisch durch Methylierung regulieren (Cornell & Ridgway, 2015; Salvi & Gadda,

2013; Zeisel, 2012). Phosphatidylcholine (PtdCho), die Synthese-Produkte der Cholindehydrogenasen, wurden außerdem als Liganden Hormon-regulierter Kernrezeptoren (nuclear hormone receptors) identifiziert (Lee et al., 2011). Kernrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, welche über Liganden aktiviert werden und so die Expression von Genen beeinflussen (Crowder et al., 2016). Die innere Kernlokalisation einiger PtdCho-Synthese-involvierten Enzyme wurde bereits nachgewiesen. PtdCho's machen den Hauptanteil der Phospholipide tierischer Zellen aus (Irvine, 2003). Phospholipid-gekoppelte Aktivierung von Kernrezeptoren wird hauptsächlich von den Enzymen reguliert, welche auf den Phospholipid-Metabolismus wirken (Crowder et al., 2016), was *Tc-Cdh* miteinschließen würde. Ein anderer Weg ist die G-Protein-Rezeptor-gekoppelte Aktivierung über Second Messenger Phospholipide, wie beispielsweise an Phosphatidylinositolen gezeigt wurde (Falasca & Ferro, 2016).

Ist es nicht die transkriptionelle Regulation, so kann zumindest angenommen werden, dass der Knockdown von *Tc-cdh* als Synthese-Mediator von Zellmembrankomponenten die Integrität eben dieser Zellmembranen beeinträchtigt und zu morphogenetischen "Fehlfaltungen" führen kann.



## Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, das neue Gen *Tc-flipflop* funktionell zu untersuchen. Dabei sollten zellmorphologische Prozesse beschrieben, das Gen auf molekularer Ebene charakterisiert und weitere Kandidatengene identifiziert werden, um letztlich eine Einordnung in molekularbiologische Signalwege vornehmen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine funktionelle Beschreibung des *flipflop* Gens in gewebemorphologischen Prozessen dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die morphogenetischen Prozesse, die den auf Kutikulaebene charakteristischen Phänotypen zugrunde liegen, schon in frühen Embryonalstadien entschieden werden, wobei spätere formgebende Funktionen nicht beeinträchtigt werden. Um die Morphologie auch auf Zellebene besser darzustellen, wäre es denkbar, Live-Imaging Versuche zusätzlich mittels Light-Sheet Mikroskopie durchzuführen. Ein wichtiger Faktor bleibt die Tatsache, dass *Tc-flipflop* ein neues Gen ohne Homologe ist und die regulatorische Einordnung andere Kandidatengene erfordert. Es liegt nahe, dass die Regulation von direktonaler Zellwanderung, Zellformänderung und somit vor allem des Cytoskeletts entscheidend für die Direktonalität des Auswachsens von Extremitäten ist. In diesem Zusammenhang weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass *Tc-flipflop* in Membran-assoziierte Rho-gekoppelte Signalwege involviert ist. Dabei bleibt weitergehend zu untersuchen, durch welche Upstream-Faktoren diese Signale induziert werden. Ein vielversprechender Ansatz ist die Kandidatenanalyse G-Protein-gekoppelter Signalwege. So wurde hier bereits beschrieben, inwiefern RhoGEF2-induzierte apikale Konstriktion eine zentrale Rolle in Invaginationsprozessen spielt und der Verlust des Proteins dazu führt, dass beispielsweise in *Drosophila* keine Ventralfurchenbildung stattfinden kann (Kölsch et al., 2007). Dazu ist die apikale Lokation von RhoGEF2 entscheidend, für welche das G-Protein Concertina (Cta), und das G-Protein-gekoppelte Transmembranprotein T48 identifiziert wurden (Kölsch et al., 2007; Urbansky et al., 2016). Zusätzlich wurde ein weiterer G-Protein gekoppelter Faktor, Smog, für die Regulation dieser RhoGEF2-regulierten Zellformveränderungsprozesse beschrieben (Kerridge et al., 2016). Vorhandene Daten des iBeetle-Screens geben einen Hinweis auf mögliche Invertierungs-Phänotypen nach *Tc-T48* und *Tc-smog* RNAi. Die Analyse membranassoziiierter Faktoren stellt weiterhin einen vielversprechenden Ansatz in der Einordnung der neuen *Tc-flipflop* Gene dar. Sowohl *Tc-T48* und *Tc-smog*, als auch weitere Wnt/Rho-assoziierte Tyrosinkinasen Komponenten, deren Knockdown mit Dorsalschlussdefekten einen Aspekt des *flipflop*-Syndroms zeigen, sind hierfür vielversprechende Kandidaten.

## **I. Danksagung**

## II. Literaturverzeichnis

- Abzhanov, A. & Kaufman, T. C.** (2000). Homologs of *Drosophila* appendage genes in the patterning of arthropod limbs. *Developmental biology* **227**, 673-689.
- Altman, B. J. & Rathmell, J. C.** (2012). Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, a008763.
- Anderson, J. M., Van Itallie, C. M. & Fanning, A. S.** (2004). Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Current opinion in cell biology* **16**, 140-145.
- Arya, R. & White, K.** (2015). Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.*
- Backer, S., Hidalgo-Sanchez, M., Offner, N., Portales-Casamar, E., Debant, A., Fort, P., Gauthier-Rouviere, C. & Bloch-Gallego, E.** (2007). Trio controls the mature organization of neuronal clusters in the hindbrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 10323-10332.
- Bakal, C., Aach, J., Church, G. & Perrimon, N.** (2007). Quantitative morphological signatures define local signaling networks regulating cell morphology. *Science* **316**, 1753-1756.
- Barrett, K., Leptin, M. & Settleman, J.** (1997). The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell* **91**, 905-915.
- Bashaw, G. J., Hu, H., Nobes, C. D. & Goodman, C. S.** (2001). A novel Dbl family RhoGEF promotes Rho-dependent axon attraction to the central nervous system midline in *Drosophila* and overcomes Robo repulsion. *The Journal of cell biology* **155**, 1117-1122.
- Beermann, A., Jay, D. G., Beeman, R. W., Hülkamp, M., Tautz, D. & Jürgens, G.** (2001). The *Short antennae* gene of *Tribolium* is required for limb development and encodes the orthologue of the *Drosophila* Distal-less protein. *Development* **128**, 287-297.
- Beermann, A., Prühs, R., Lutz, R. & Schröder, R.** (2011). A context-dependent combination of Wnt receptors controls axis elongation and leg development in a short germ insect. *Development* **138**, 2793-2805.
- Bishop, A. L. & Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal* **348**, 241-255.
- Bolognesi, R., Beermann, A., Farzana, L., Wittkopp, N., Lutz, R., Balavoine, G., Brown, S. J. & Schröder, R.** (2008a). *Tribolium* Wnts: evidence for a larger repertoire in insects with overlapping expression patterns that suggest multiple redundant functions in embryogenesis. *Development genes and evolution* **218**, 193-202.
- Bolognesi, R., Farzana, L., Fischer, T. D. & Brown, S. J.** (2008b). Multiple Wnt genes are required for segmentation in the short-germ embryo of *Tribolium castaneum*. *Current biology : CB* **18**, 1624-1629.
- Borghi, N., Lowndes, M., Maruthamuthu, V., Gardel, M. L. & Nelson, W. J.** (2010). Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-

- mediated adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13324-13329.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M.** (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-118.
- Braga, V. M. M.** (1999). Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology* **52**, 197-202.
- Brown, S. J., Shippy, T. D., Miller, S., Bolognesi, R., Beeman, R. W., Lorenzen, M. D., Bucher, G., Wimmer, E. A. & Klingler, M.** (2009). The Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): A Model for Studies of Development and Pest Biology. *Cold Spring Harbor protocols* **2009**, pdb.emo126-pdb.emo126.
- Cadigan, K. M. & Nusse, R.** (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**, 3286-3305.
- Cadigan, K. M. & Peifer, M.** (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a002881.
- Christen, B. & Slack, J. M.** (1998). All limbs are not the same. *Nature* **395**, 230-231.
- Cohen, S. M.** (1990). Specification of limb development in the *Drosophila* embryo by positional cues from segmentation genes. *Nature* **343**, 173-177.
- Conte, V., Munoz, J. J., Baum, B. & Miodownik, M.** (2009). Robust mechanisms of ventral furrow invagination require the combination of cellular shape changes. *Phys Biol* **6**, 016010.
- Cornell, R. B. & Ridgway, N. D.** (2015). CTP:phosphocholine cytidyltransferase: Function, regulation, and structure of an amphitropic enzyme required for membrane biogenesis. *Prog Lipid Res* **59**, 147-171.
- Crowder, M. K., Seacrist, C. D. & Blind, R. D.** (2016). Phospholipid regulation of the nuclear receptor superfamily. *Adv Biol Regul*.
- Davidson, L. A.** (2012). Epithelial machines that shape the embryo. *Trends Cell Biol* **22**, 82-87.
- Debant, A., SerraPages, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S. H. & Streuli, M.** (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5466-5471.
- Dinger, M. E., Pang, K. C., Mercer, T. R. & Mattick, J. S.** (2008). Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000176.
- Dönitz, J., Schmitt-Engel, C., Grossmann, D., Gerischer, L., Tech, M., Schoppmeier, M., Klingler, M. & Bucher, G.** (2014). iBeetle-Base: a database for RNAi phenotypes in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Nucleic acids research*.
- Dujon, B.** (1996). The yeast genome project: What did we learn? *Trends in Genetics* **12**, 263-270.
- Falasca, M. & Ferro, R.** (2016). Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Adv Biol Regul* **60**, 88-93.

- Fang, J., Yu, Z., Lian, M., Ma, H., Tai, J., Zhang, L. & Han, D.** (2012). Knockdown of zinc finger protein, X-linked (ZFX) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Cell Biochem* **360**, 301-307.
- Fatica, A. & Bozzoni, I.** (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature reviews. Genetics* **15**, 7-21.
- Fernandez-Teran, M. A., Hinchliffe, J. R. & Ros, M. A.** (2006). Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 2521-2537.
- Forrester, W. C., Dell, M., Perens, E. & Garriga, G.** (1999). A *C. elegans* Ror receptor tyrosine kinase regulates cell motility and asymmetric cell division. *Nature* **400**, 881-885.
- Furuse, M. & Tsukita, S.** (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* **16**, 181-188.
- Gelbart, M. A., He, B., Martin, A. C., Thiberge, S. Y., Wieschaus, E. F. & Kaschube, M.** (2012). Volume conservation principle involved in cell lengthening and nucleus movement during tissue morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 19298-19303.
- Gentile, A., Lazzari, L., Benvenuti, S., Trusolino, L. & Comoglio, P. M.** (2011). Ror1 is a pseudokinase that is crucial for Met-driven tumorigenesis. *Cancer Res* **71**, 3132-3141.
- Goicoechea, S. M., Awadia, S. & Garcia-Mata, R.** (2014). I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adh Migr* **8**.
- Gómez-Orte, E., Sáenz-Narciso, B., Moreno, S. & Cabello, J.** (2013). Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends in genetics : TIG* **29**, 545-553.
- Goodrich, L. V. & Strutt, D.** (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development* **138**, 1877-1892.
- Green, J., Nusse, R. & van Amerongen, R.** (2014). The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in Wnt signal transduction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **6**.
- Green, J. L., Inoue, T. & Sternberg, P. W.** (2008). Opposing Wnt pathways orient cell polarity during organogenesis. *Cell* **134**, 646-656.
- Gros, J., Hu, J. K., Vinegoni, C., Feruglio, P. F., Weissleder, R. & Tabin, C. J.** (2010). WNT5A/JNK and FGF/MAPK pathways regulate the cellular events shaping the vertebrate limb bud. *Current biology : CB* **20**, 1993-2002.
- Gross, C. T. & McGinnis, W.** (1996). DEAF-1, a novel protein that binds an essential region in a Deformed response element. *Embo Journal* **15**, 1961-1970.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357.
- Häcker, U. & Perrimon, N.** (1998). *DRhoGEF2* encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 274-284.
- Harden, N.** (2002). Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation* **70**, 181-203.

- Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I. & Taira, M.** (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**, 5227-5239.
- Hilbrant, M., Horn, T., Koelzer, S. & Panfilio, K. A.** (2016). The beetle amnion and serosa functionally interact as apposed epithelia. *eLife* **5**.
- Hill, E., Broadbent, I. D., Chothia, C. & Pettitt, J.** (2001). Cadherin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* **305**, 1011-1024.
- Ho, H. Y. H., Susman, M. W., Bikoff, J. B., Ryu, Y. K., Jonas, A. M., Hu, L., Kuruvilla, R. & Greenberg, M. E.** (2012). Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 4044-4051.
- Hochreiter-Hufford, A. & Ravichandran, K. S.** (2013). Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a008748.
- Hopyan, S., Sharpe, J. & Yang, Y.** (2011). Budding behaviors: Growth of the limb as a model of morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **240**, 1054-1062.
- Horn, T. & Panfilio, K. A.** (2016). Novel functions for *Dorsocross* in epithelial morphogenesis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development* **143**, 3002-3011.
- Hornbruch, A. & Wolpert, L.** (1970). Cell division in the early growth and morphogenesis of the chick limb. *Nature* **226**, 764-766.
- Horne-Badovinac, S., Hill, J., Gerlach, G., 2nd, Menegas, W. & Bilder, D.** (2012). A screen for round egg mutants in *Drosophila* identifies tricornered, furry, and misshapen as regulators of egg chamber elongation. *G3* **2**, 371-378.
- Hynes, R. O. & Zhao, Q.** (2000). The evolution of cell adhesion. *The Journal of cell biology* **150**, F89-96.
- Ingham, P. W.** (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* **335**, 25-34.
- Irvine, R. F.** (2003). Nuclear lipid signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 349-360.
- Jacinto, A. & Martin, P.** (2001). Morphogenesis: unravelling the cell biology of hole closure. *Current biology : CB* **11**, R705-707.
- Jidigam, V. K., Srinivasan, R. C., Patthey, C. & Gunhaga, L.** (2015). Apical constriction and epithelial invagination are regulated by BMP activity. *Biology open* **4**, 1782-1791.
- Kaessmann, H.** (2010). Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. *Genome Res* **20**, 1313-1326.
- Kaessmann, H., Vinckenbosch, N. & Long, M.** (2009). RNA-based gene duplication: mechanistic and evolutionary insights. *Nature reviews. Genetics* **10**, 19-31.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M. & Nakagawa, M.** (1999). Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Current opinion in cell biology* **11**, 591-596.

- Kaufmann, N., Wills, Z. P. & Van Vactor, D.** (1998). *Drosophila* Rac1 controls motor axon guidance. *Development* **125**, 453-461.
- Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D. & Skoglund, P.** (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 897-922.
- Kerridge, S., Munjal, A., Philippe, J. M., Jha, A., de las Bayonas, A. G., Saurin, A. J. & Lecuit, T.** (2016). Modular activation of Rho1 by GPCR signalling imparts polarized myosin II activation during morphogenesis. *Nature cell biology* **18**, 261-270.
- Kiehart, D. P.** (1999). Wound healing: The power of the purse string. *Current biology : CB* **9**, R602-605.
- (2015). Epithelial morphogenesis: apoptotic forces drive cell shape changes. *Developmental cell* **32**, 532-533.
- Kiehart, D. P., Galbraith, C. G., Edwards, K. A., Rickoll, W. L. & Montague, R. A.** (2000). Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *The Journal of cell biology* **149**, 471-490.
- Knust, E.** (1996). *Drosophila* morphogenesis: follow-my-leader in epithelia. *Current biology : CB* **6**, 379-381.
- Kölsch, V., Seher, T., Fernandez-Ballester, G. J., Serrano, L. & Leptin, M.** (2007). Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science* **315**, 384-386.
- Kondo, T. & Hayashi, S.** (2015). Mechanisms of cell height changes that mediate epithelial invagination. *Development, growth & differentiation* **57**, 313-323.
- Ladoux, B., Anon, E., Lambert, M., Rabodzey, A., Hersen, P., Buguin, A., Silberzan, P. & Mege, R. M.** (2010). Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophysical journal* **98**, 534-542.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lanier, L. M. & Gertler, F. B.** (2000). From Abl to actin: Abl tyrosine kinase and associated proteins in growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 80-87.
- Lecuit, T. & Lenne, P. F.** (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 633-644.
- Lee, J. M., Lee, Y. K., Mamrosh, J. L., Busby, S. A., Griffin, P. R., Pathak, M. C., Ortlund, E. A. & Moore, D. D.** (2011). A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature* **474**, 506-510.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Lewis, W. H.** (1947). Mechanics of invagination. *Anat Rec* **97**, 139-156.
- Long, M., Betran, E., Thornton, K. & Wang, W.** (2003). The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nature reviews. Genetics* **4**, 865-875.

- Luo, L., Jan, L. Y. & Jan, Y. N.** (1997). Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 81-86.
- Machesky, L. M. & Hall, A.** (1996). Rho: A connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology* **6**, 304-310.
- Manser, E.** (2005). RHO Family GTPases. In *Proteins and Cell Regulation* (ed. E. Manser).
- Martin, A. C., Kaschube, M. & Wieschaus, E. F.** (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* **457**, 495-499.
- Martin, P. & Lewis, J.** (1992). Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing. *Nature* **360**, 179-183.
- Masliyah-Planchon, J., Garinet, S. & Pasmant, E.** (2016). RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget* **7**, 38892-38907.
- McLysaght, A. & Hurst, L. D.** (2016). Open questions in the study of de novo genes: what, how and why. *Nature reviews. Genetics* **17**, 567-578.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S.** (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics* **10**, 155-159.
- Mikels, A. J. & Nusse, R.** (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS biology* **4**, e115.
- Mizuno, T., Tsutsui, K. & Nishida, Y.** (2002). *Drosophila* myosin phosphatase and its role in dorsal closure. *Development* **129**, 1215-1223.
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T., Schott, S., Guarner, A. & Suzanne, M.** (2015). Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* **518**, 245-248.
- Mouse Genome Sequencing, C., Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., et al.** (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562.
- Neme, R. & Tautz, D.** (2014). Evolution: dynamics of de novo gene emergence. *Current biology : CB* **24**, R238-240.
- Niehrs, C.** (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 767-779.
- Nobes, C. & Hall, A.** (1994). Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Current opinion in genetics & development* **4**, 77-81.
- Nobes, C. D. & Hall, A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M. & Minami, Y.** (2008). Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. *The Journal of biological chemistry* **283**, 27973-27981.
- Nübler-Jung, K.** (1987). Insect epidermis: disturbance of supracellular tissue polarity does not prevent the expression of cell polarity. *Roux's Archives of Developmental Biology* **196**, 286-289.



- Nusse, R.** (2012). Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**.
- Nüsslein-Volhard, C., Frohnhofer, H. G. & Lehmann, R.** (1987). Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* **238**, 1675-1681.
- Padash Barmchi, M., Rogers, S. & Häcker, U.** (2005). *DRhoGEF2* regulates actin organization and contractility in the *Drosophila* blastoderm embryo. *The Journal of cell biology* **168**, 575-585.
- Palmieri, N., Kosiol, C. & Schlötterer, C.** (2014). The life cycle of *Drosophila* orphan genes. *eLife* **3**, e01311.
- Panfilio, K. A., Oberhofer, G. & Roth, S.** (2013). High plasticity in epithelial morphogenesis during insect dorsal closure. *Biology open* **2**, 1108-1118.
- Panganiban, G.** (2000). *Distal-less* function during *Drosophila* appendage and sense organ development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **218**, 554-562.
- Pauli, A., Rinn, J. L. & Schier, A. F.** (2011). Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nature reviews. Genetics* **12**, 136-149.
- Philipp, I., Aufschnaiter, R., Ozbek, S., Pontasch, S., Jenewein, M., Watanabe, H., Rentzsch, F., Holstein, T. W. & Hobmayer, B.** (2009). Wnt/beta-catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4290-4295.
- Pinto-Teixeira, F., Konstantinides, N. & Desplan, C.** (2016). Programmed cell death acts at different stages of *Drosophila* neurodevelopment to shape the central nervous system. *FEBS letters* **590**, 2435-2453.
- Plutoni, C., Bazellieres, E. & Gauthier-Rouviere, C.** (2016). P-cadherin-mediated Rho GTPase regulation during collective cell migration. *Small GTPases* **7**, 156-163.
- Prabh, N. & Rodelsperger, C.** (2016). Are orphan genes protein-coding, prediction artifacts, or non-coding RNAs? *BMC Bioinformatics* **17**, 226.
- Razin, S. V., Borunova, V. V., Maksimenko, O. G. & Kantidze, O. L.** (2012). Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry (Mosc)* **77**, 217-226.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Brown, S. J., Denell, R., Beeman, R. W., Gibbs, R., Beeman, R. W., Brown, S. J., Bucher, G., et al.** (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* **452**, 949-955.
- Salvi, F. & Gadda, G.** (2013). Human choline dehydrogenase: medical promises and biochemical challenges. *Arch Biochem Biophys* **537**, 243-252.
- Sarkissian, T., Timmons, A., Arya, R., Abdelwahid, E. & White, K.** (2014). Detecting apoptosis in *Drosophila* tissues and cells. *Methods* **68**, 89-96.
- Sarrazin, A. F., Peel, A. D. & Averof, M.** (2012). A segmentation clock with two-segment periodicity in insects. *Science* **336**, 338-341.
- Saunders, J. W., Jr. & Gasseling, M. T.** (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Developmental biology* **5**, 147-178.
- Savill, J.** (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* **53**, 491-508.

- Sawyer, J. M., Harrell, J. R., Shemer, G., Sullivan-Brown, J., Roh-Johnson, M. & Goldstein, B.** (2010). Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Developmental biology* **341**, 5-19.
- Schinko, J., Posnien, N., Kittelmann, S., Koniszewski, N. & Bucher, G.** (2009). Single and double whole-mount in situ hybridization in red flour beetle (*Tribolium*) embryos. *Cold Spring Harbor protocols* **2009**, pdb prot5258.
- Schlessinger, K., Hall, A. & Tolwinski, N.** (2009). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* **23**, 265-277.
- Schlötterer, C.** (2015). Genes from scratch--the evolutionary fate of de novo genes. *Trends in genetics : TIG* **31**, 215-219.
- Schröder, R., Beermann, A., Wittkopp, N. & Lutz, R.** (2008). From development to biodiversity--*Tribolium castaneum*, an insect model organism for short germband development. *Development genes and evolution* **218**, 119-126.
- Shippy, T. D., Coleman, C. M., Tomoyasu, Y. & Brown, S. J.** (2009). Concurrent in situ hybridization and antibody staining in red flour beetle (*Tribolium*) embryos. *Cold Spring Harbor protocols* **2009**, pdb prot5257.
- Spencer, A. K., Siddiqui, B. A. & Thomas, J. H.** (2015). Cell shape change and invagination of the cephalic furrow involves reorganization of F-actin. *Developmental biology*.
- Stuart, J. J., Brown, S. J., Beeman, R. W. & Denell, R. E.** (1991). A deficiency of the homeotic complex of the beetle *Tribolium*. *Nature* **350**, 72-74.
- Tada, M. & Kai, M.** (2009). Noncanonical Wnt/PCP signaling during vertebrate gastrulation. *Zebrafish* **6**, 29-40.
- Takeichi, M.** (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology* **7**, 619-627.
- Takeuchi, S., Takeda, K., Oishi, I., Nomi, M., Ikeya, M., Itoh, K., Tamura, S., Ueda, T., Hatta, T., Otani, H., et al.** (2000). Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes to Cells* **5**, 71-78.
- Tautz, D. & Domazet-Lošo, T.** (2011). The evolutionary origin of orphan genes. *Nature reviews. Genetics* **12**, 692-702.
- Urbansky, S., Gonzalez Avalos, P., Wosch, M. & Lemke, S.** (2016). Folded gastrulation and T48 drive the evolution of coordinated mesoderm internalization in flies. *eLife* **5**.
- van Amerongen, R. & Nusse, R.** (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205-3214.
- Varner, V. D. & Nelson, C. M.** (2014). Cellular and physical mechanisms of branching morphogenesis. *Development* **141**, 2750-2759.
- Varner, V. D. & Taber, L. A.** (2012). Not just inductive: a crucial mechanical role for the endoderm during heart tube assembly. *Development* **139**, 1680-1690.
- Veraksa, A., Kennison, J. & McGinnis, W.** (2002). DEAF-1 function is essential for the early embryonic development of *Drosophila*. *Genesis* **33**, 67-76.
- Walck-Shannon, E. & Hardin, J.** (2014). Cell intercalation from top to bottom. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 34-48.

- Wang, S., Tsarouhas, V., Xylourgidis, N., Sabri, N., Tiklova, K., Nautiyal, N., Gallio, M. & Samakovlis, C.** (2009). The tyrosine kinase Stitcher activates Grainy head and epidermal wound healing in *Drosophila*. *Nature cell biology* **11**, 890-895.
- Wilson, C., Goberdhan, D. C. & Steller, H.** (1993). *Dror*, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a *Drosophila* homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7109-7113.
- Wissler, L., Gadau, J., Simola, D. F., Helmkamp, M. & Bornberg-Bauer, E.** (2013). Mechanisms and dynamics of orphan gene emergence in insect genomes. *Genome Biol Evol* **5**, 439-455.
- Wong, H. C., Mao, J., Nguyen, J. T., Srinivas, S., Zhang, W., Liu, B., Li, L., Wu, D. & Zheng, J.** (2000). Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway. *Nat Struct Biol* **7**, 1178-1184.
- Wyngaarden, L. A., Vogeli, K. M., Ciruna, B. G., Wells, M., Hadjantonakis, A. K. & Hopyan, S.** (2010). Oriented cell motility and division underlie early limb bud morphogenesis. *Development* **137**, 2551-2558.
- Xu, D., Woodfield, S. E., Lee, T. V., Fan, Y., Antonio, C. & Bergmann, A.** (2014). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly* **3**, 78-90.
- Young, P. E., Richman, A. M., Ketchum, A. S. & Kiehart, D. P.** (1993). Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev* **7**, 29-41.
- Zeisel, S. H.** (2012). Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. *Mutat Res* **733**, 34-38.
- Zhang, C. & Rasband, M. N.** (2016). Cytoskeletal control of axon domain assembly and function. *Curr Opin Neurobiol* **39**, 116-121.
- Zhang, W. & Liu, H. T.** (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* **12**, 9-18.
- Zheng, J., Cahill, S. M., Lemmon, M. A., Fushman, D., Schlessinger, J. & Cowburn, D.** (1996). Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J Mol Biol* **255**, 14-21.
- Zhou, J., Pal, S., Maiti, S. & Davidson, L. A.** (2015). Force production and mechanical accommodation during convergent extension. *Development* **142**, 692-701.
- Zhu, Z., Li, K., Xu, D., Liu, Y., Tang, H., Xie, Q., Xie, L., Liu, J., Wang, H., Gong, Y., et al.** (2013). ZFX regulates glioma cell proliferation and survival in vitro and in vivo. *J Neurooncol* **112**, 17-25.
- Zinovyeva, A. Y., Yamamoto, Y., Sawa, H. & Forrester, W. C.** (2008). Complex network of Wnt signaling regulates neuronal migrations during *Caenorhabditis elegans* development. *Genetics* **179**, 1357-1371.

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Genannotationsmodelle für <i>Tc-flipflop</i> mit Lage der verwendeten NOFs.	24
Abb. 2 Expressionsnachweis der mRNA von <i>Tc-ff</i> im WT.	25
Abb. 3 Expressionsnachweis der <i>Tc-Flipflop</i> Proteine im Wildtyp.	26
Abb. 4 Western Blot Analyse der <i>Tc-Flipflop</i> Proteine.	27
Abb. 5 Statistische Verteilung larvaler Kutikulaphänotypen nach RNAi.	29
Abb. 6 Analyse larvaler Kutikulaphänotypen nach RNAi.	29
Abb. 7 Stammspezifischer Vergleich larvaler Phänotypen nach <i>Tc-ff1</i> RNAi.	29
Abb. 8 Phänotypische Varianzen der larvalen Kutikula nach <i>Tc-flipflop1</i> RNAi.	30
Abb. 9 Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach <i>Tc-flipflop2</i> RNAi.	31
Abb. 10 Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach <i>Tc-ff1-ff2</i> RNAi.	32
Abb. 11 Detailaufnahmen von larvalen Kutikulas nach <i>Tc-flipflop</i> RNAi.	33
Abb. 12 Semidünnschnitt der Saggitalebene eines Embryos nach <i>Tc-ff1</i> RNAi.	34
Abb. 13 Apikale vs. basale Konstriktion in evaginiertem und invaginiertem Gewebe.	35
Abb. 14 Ausschnitte aus Live-Imaging Aufnahmen nach <i>Tc-flipflop</i> RNAi.	35
Abb. 15 Expressionsnachweis von Dcp-1 nach <i>Tc-flipflop</i> RNAi.	36
Abb. 16 Expressionsnachweis von Dcp-1 in Wildtypembryonen.	37
Abb. 17 Genannotationsmodell für <i>Tc-RhoGEF2</i> .	38
Abb. 18 Expressionsnachweis der mRNA von <i>Tc-RhoGEF2</i> im WT.	38
Abb. 19 Phänotypische Ausprägung der larvalen Kutikula nach <i>Tc-RhoGEF2</i> RNAi.	40
Abb. 20 Expressionsnachweis von Dcp-1 nach <i>Tc-RhoGEF2</i> RNAi.	42
Abb. 21 Direktionalität extraembryonaler Membranen in der Embryogenese.	43
Abb. 22 Phänotypische Ausprägungen nach <i>Tc-ff1-RhoGEF2</i> -Doppel RNAi.	44
Abb. 23 Live-Imaging nach <i>Tc-ff1-RhoGEF2</i> -Doppel RNAi.	44
Abb. 24 Embryonale Morphologie nach RNAi.	45
Abb. 25 Phänotypische Varianzen nach <i>Tc-RhoGEF 18</i> RNAi.	47
Abb. 26 Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach <i>Tc-Trio</i> RNAi.	47
Abb. 27 Annotation der Genorganisation für <i>Tc-ror1</i> .	48
Abb. 28 Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach <i>Tc-ror1</i> RNAi.	49
Abb. 29 Phänotypische Varianz nach <i>Tc-ror2</i> RNAi.	50
Abb. 30 Phänotypische Varianz larvaler Kutikulas nach <i>Tc-Cad96Ca</i> RNAi.	52
Abb. 31 Annotation der Genorganisation und Lage der NOFs für <i>Tc-zfx</i> .	53
Abb. 32 Phänotypische Varianzen larvaler Kutikulas nach <i>Tc-zfx</i> RNAi.	54
Abb. 33 Annotation der Genorganisation und NOF-Position für <i>Tc-cdh</i> .	55
Abb. 34 Phänotypische Ausprägungen nach <i>Tc-cdh</i> RNAi.	56

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 35 Phänotypische Varianzen nach <i>Tc-cdh-like TC015717</i> RNAi.	56
Abb. 36 Phänotypische Ausprägungen der larvalen Kutikula nach <i>Tc-DEAF</i> RNAi.	58
Abb. 37 Annotation der Genorganisation und Lage der NOFs für <i>Tc-dll</i> .	59
Abb. 38 NOF-spezifische phänotypische Ausprägungen nach <i>Tc-dll</i> RNAi.	60
Abb. 39 Konservierte Domänen der ursprünglichen <i>Tc-RhoGEF</i> Annotation.	69
Abb. 40 Konservierte Domänen der analysierten RTK-Kandidaten.	77
Abb. 41 Mögliche Einordnung von <i>Tc-flipflop</i> in eine Ror/Rho-Signalkaskade.	78
Abb. 42 <i>Tc-flipflop1</i> Alignment.	99
Abb. 43 <i>Tc-flipflop2</i> Alignment.	99

## IV. Anhang

### 1. Abkürzungsverzeichnis

A1	Abdominalsegment 1
Abd	Abdomen
Ant	Antenne
A-P	Anterior-Posterior
AS	Aminosäuren
Ba	Beinanlage
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
C2H2	<i>Cystein-2-Histidin-2</i>
<i>Cad96Ca</i>	<i>Cadherin96Ca</i>
CAM-1	<i>Calmodulin-1</i>
CCM	<i>Collective Cell Migration</i>
cdh	Cholin-Dehydrogenase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CE	<i>Convergent Extension</i> , konvergente Extension
CPC	<i>Coding Potential Calculator</i>
Cta	<i>Concertina</i>
D	Dotter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Biotium
<i>dco</i>	<i>discs overgrown</i>
Dcp-1	<i>Death caspase-1</i>
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
<i>DEAF1</i>	<i>Deformed Epidermal Autoregulatory Factor-1</i>
DEP	Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin
<i>Dfd</i>	<i>Deformed</i>
DH	<i>Dbl Homology</i>
Dlg1	<i>Drosophila disc large tumor suppressor</i>
<i>dll</i>	<i>distalless</i>
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure

## Anhang

dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
Dpp	<i>Decapentaplegic</i>
<i>dsh</i>	<i>dishevelled</i>
dsRNA	Doppelstrang-RNA
D-V	Dorso-Ventral
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ff</i>	<i>flipflop</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GA	Georgia
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
<i>garz</i>	<i>gartenzwerg</i>
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
GPCR	<i>G-Protein Coupled Receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hd	Hinterdarm
IGc2	<i>Immunoglobulin-2</i>
<i>itsn2</i>	<i>intersectin-2 isoform</i>
JNK	<i>Jun-n terminal Kinase</i>
K	Kopf
kD	Kilodalton
L	Bein
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LE	<i>Leading Edge cells</i>
lnc	<i>long non-coding</i>
LRP	<i>Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
M	molare Masse
MAPK	<i>Mitogen-Activating Protein Kinase</i>
<i>mcm</i>	<i>mini-chromosome maintenance complex-binding protein</i>
<i>Mer</i>	<i>Merlin</i>
min	Minute
<i>mnb</i>	<i>minibrain</i>
Mnd	Mandibel
mRNA	<i>messenger RNA</i>

## Anhang

Musk	<i>Siehe</i> Muscle Skeletal Receptor Tyrosine Kinase
Mx	Maxille
MYND	<i>myeloid, Nervy, und DEAF-1</i>
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nGFP	<i>nuclear Green Fluorescent Protein</i> , Grün-fluoreszierendes Protein
NOF	nicht-überlappendes Fragment
<i>nrk</i>	<i>neurospecific receptor kinase</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , Leserahmen
<i>otk</i>	<i>off-track</i>
<i>pav</i>	<i>pavarotti</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzsäure
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i> , Planare Zellpolarität
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	<i>post synaptic density protein</i> , <i>Dlg1</i> und <i>zo-1</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
<i>Plekhg5</i>	<i>Pleckstrin homology domain-containing family G member 5 isoform</i>
PtdCho	<i>Phosphatidylcholin</i>
Ptk7	<i>Protein Tyrosine Kinase</i>
<i>Rac</i>	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
<i>Rap</i>	<i>Ras-related protein</i>
Rho	<i>Ras homology</i>
<i>riq</i>	<i>riquiqui</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
<i>Rok</i>	<i>Rho kinase</i>
Ror	<i>Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	<i>Transmembrane Receptor Tyrosine Kinase</i>
Ryk	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SAND	<i>SP100, AIRE-1, NucP41/75 und DEAF-1</i>
SB	San Bernardino
<i>sd</i>	<i>scalloped</i>



## Anhang

si	<i>small interfering</i>
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
TAE	<i>Tris base + acetic acid + EDTA</i>
<i>Tc</i>	<i>Tribolium castaneum</i>
<i>tum</i>	<i>tumbleweed</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
Tx	Thorax
Ug	Urogomphi
UV	Ultraviolettstrahlung
Wnt	<i>wingless (wg) + int-1</i>
WT	Wildtyp
yki	<i>yorkie</i>
<i>zfx</i>	<i>zinc finger protein, X-liked</i>
<i>zip</i>	<i>zipper</i>
zo-1	<i>zonula occludens-1</i>

## 2. Zusätzliche Tabellen

### Tc-flipflop Alignments

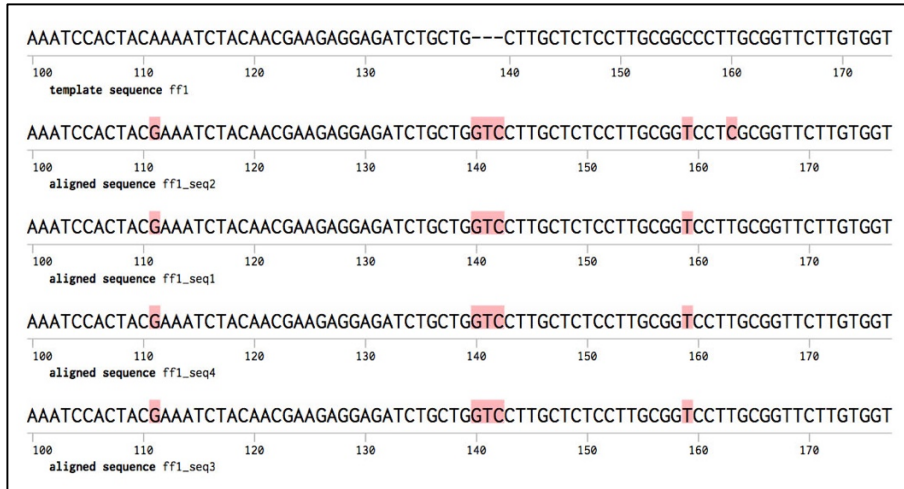


Abb. 42 *Tc-flipflop1* Alignment. Exemplarischer Ausschnitt. Skalierung: Basennummer ab Startcodon.

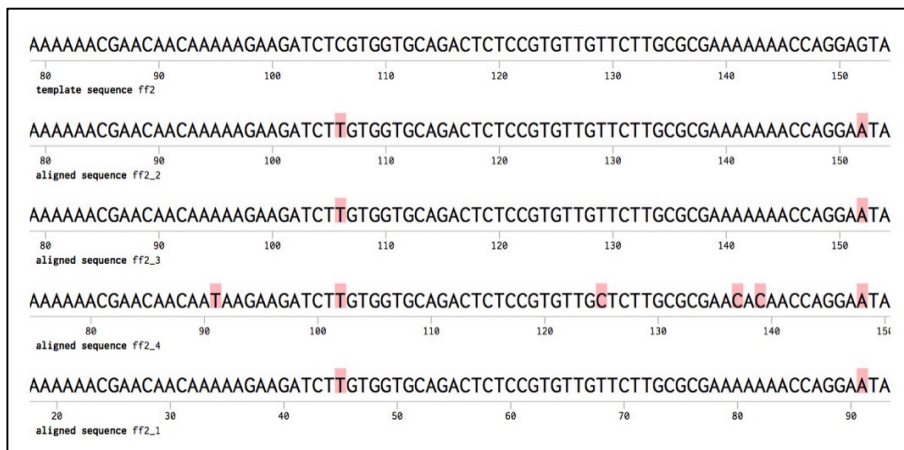


Abb. 43 *Tc-flipflop2* Alignment. Exemplarischer Ausschnitt. Skalierung: Basennummer ab Startcodon.

### Silencer-Sequenzen

Cad96Ca TC004976 iB_03886	ACCCGAATTCGAGCCTTAATTTCCCGGGAAGTAAACAAAATGGGTTGGTA CCGCCGCCTTTTCTCACTATTCCGAATTTTAACCAACGTCGAAAAGCCCC ACAACGGCTACGTCAAGACAACCGCACTTTCAACCAAACCAAACGTTAC GACCCTTCTAAGACCGATTAAAATCGAACCAGTTAAAAATGAAATTGATG AAAAAGAGGAAGCAACGACGAGGAAAATCACTAAGACGACACCGACAG TTCAACCCCTTAATAAAACTATAGACCAAGCGGTTAAAACACCACCTGAT TTGGCCGTTACTGTTGTACCAATTATCTCAGTTTGTGCTGTGTTTCTCATG GTTGGCATCATTGCCATAGTTTTTAGGAAGAAAATACATTTAGGGAAACC CAAAAGTTCCAAAGACGATATTAGGAAACCATCTTCAGGTGCAATTGTTC TACCAGAAGACACAACCTATTGGTATGCAACAATGGAGAGGACCCACAG
CDH like TC016355 iB_09229	AACGCACCTCACTTTTACCCATCGGCTAGTTCAAATTATCCCAATTACCCT AAACAACACGCTCCGTATCATTACCAACAGGGAGTAAAAAGTACGGGAT TTAGGCATAATGAGCAATTCCACAGGAATCATCCCCAAATGCCTAATCCT TTCATGTCGACGCCTAGGCCACAAAGGGCGTATAATCAGCAGGGATTAA TCAAGGGTATCAAGGATACCAACATAATTATCCCGACTACCAACAGGA

# Anhang

CDH like TC033300 iB_05806	CTGGCAATGAAGGATGGAGTTATAATGAAGTACTACCCTATTTTCTAAAG AGTGAAGATAATAAGCAAGCGGATAGTATGGATAGGGGGTACCATTCAA CAGGGGGGTTGTTGACAGTGTACAGTTTCCCTATCATCCACCACTATCA CAGGCGTTGCTAAAGGCGGCGCAAGAGTTGGGGTACCCAATCAGGGACT TGAATGGAGCGTATCATACTGGGTTTAAACATTGCGCAAACAACCAATAGA AATGGGTTCGAGGTTAAGTACGGCTAAAGCTTTTCTAAGGCCGTTCAAAAA TCGAAGAACTTGAATATTTTGATGAACTCAACCGTAACCAGAGTTCTCA TCAATACAACCACGAAACAGGCATATGGAGTCGAAGTTATTAATAATGGC GTCAAACAAGTAATTTACGCGAGTAAAGAGGTTATAGTATCTGGGGGTGC TATCAACTCGCCCCAAATCCTACT
CDH like TC015717 iB_05882	TTCACCAAACTCGCTACCAGACTTTTGCCGTGGCAATGGAATACATAGT GAATGAAAGGGGTCCGATGACCTCACTGGGAGGTGTGGAGGGGCTAGCG TTCGTCAACACGAAATATGCCCCAAAATCGGGGTCTTGCCCCGACATACA ATTCCACTTCGCCCCCTCCAGTATAAATTCCGATGGGGAACAAGTGA AAATCACAGGATTGCGAGACAGTGTGTACAACACTGTGTACAACCCCTT AAAAACGCCGAGACTTGGAACATTCTACCCCTTTTACTCAGACCCAGGAG CACGGGTTGGGTGCGTCTCAAGTCCAAAGACCCCAATATCTACCCCGACA TTAACCCCAATTACTTCACGCATAAAGAGGACATTTTGACTCTCACTGAA GGGATCAGGATTGCCCTAAACGCTCTCAAACACCCAATCCTTCCAACGGTT CAATTCCCGACCCCATAAAATCCCGTTCCCGAAG
CDH like TC015718 iB_05883	TTCGTCAACACGAAATACGGTAACCGTTTCTTGCCCCGACGTCCAATTCCA CATGGCACCTGCCAGTATAAATTTCGGACGCCGGCGTCCGAGTCCGTAAAG TTTTAGGACTTACGGACCACCTCTACAACACGGTGTACCGCCCTATCGCC AATAAGGACGTCTTCACGCTTATGCCCTCCTCCTGAGGCCCAAATCGCG CGGTTGGATCCGCCTCCAAAGCAAAAATCCCTTCGTGCCGCCTGTGATCA ACGCCAACTATTTTGACGATCCCATTTGATATTAAGTACTAGTGGAGGGG GCAAAGATGGCGATTAAAATCGGCGAAGCCCAAGCTTTTAAGCAGTTTGG GGCAAGAGTGCATCGAATCAAGTTTCCGAATTGTCGGGATTTTGAGTTTG GGAGTGATGAGTATTTGGAGTGCCATATAAGGACGATTTTCGATGACGATT TACCATCCGGTGGGGACGTGCAAGATGGGGCCGAGTTGGGATAAGGAGG CTGTG
Cholin DH TC010931 iB_04939	GAACCAGAAGACCCACAAAATCCACAGCTGCGAAAAGTTTTACCATAA GACCGACTTTTCTAAGGCCAAGAAGTTCGCGGTTTTATCGGACTGAATTCC AGAGATCCAAAGGAGCCACCTCTCATGCAACCAAATTACTTGACTGATGA GGAAGACGTCAAACGAATGGTTGCAGGAATTTCGATTGCTCAAAATTTGG CAAACACTACAATCCTTACTACAAAGTATGGTATACAAATGGTGAACACT GATTATGGAGACTGTTCTAGAACTACACTTTCGACTCGGATGAATTCTG GGCATGTGCTTTGAGGTATGATACGGGTCCAGAAAATCACCAGTCTTGTT CCTGCAAAATGGGTCCGGCTTCGGACCCATCGGCGGTAGTGGATCCGAAA TTGCAAGTTTCATGGTATTGAAGTCTCAGGATTATGGATGCGTCAGTGAT GCCTACAGTTCTCTCGGGAAATACGCATGCAACCGTT
Cholin DH TC010931 iB_04939_2	CGCAATCGTCCAAACTTACACGTGATGATCAATTCAACAGCCACCAAAAT CCTGATCAATAGTAACGACACAGCAAAAACAATCTCAGCAGTAGAATTTA CGTACAATAACCAGTCTTTTACCGTAAAAGTGAGACGCGAAGCTATCGTA TCAGCTGGTGCAATCAACACACCTCACCTCCTTTTACTATCTGGAATAGGC CCTAGAGAAGAAGTAGACAAAGTGGGGATCGAACAG
Cholin DH TC010931 iB_04939_3	TTGGCCAAAACCTCAAAAACCACGTATCGTTTGCGGTAAATTTCCAATTG ACAAAATCGAAAATTATAACGACTTGAAGTGAACACTGTGAGGGAGT ATTTGACGGAGAGAAGAGGCCCATGTCTTCGACCGGAGTCACACAAGTC GCTGCCAGAATTAGCTCGAAATATGCCAATCCTGATGGC
Cholin DH TC010931 iB_04939_4	GTTGGGGTTACAAGGACGTGGAGGAGTACTTCAAGAAGTCGGAAGGGAA CCGGGATATTGGTGATGGGGTTGAAGGGAGGTATCATAGCTCTGATGGTC CCATGTTGGTCCAGAGGTTTCCCGATCAGCCCCAAATTGCTGAAGATGTT TTGAGGGCTGGGGCGGAGTTGGGGTATCCAGTGTTGGGGATTGAACGG GGAGCAGCATTGGGGGTTTACCATT
Cholin DH TC010931 iB_04939_5	GTTGAAAATGTCTTGTGCGCCAACGAGCCCTACATCGGCCCCACCCCTAG ACCGGACCTGTTTCGGGGGCTCCTACATCGTCTTCATGCACCTCCTCAACA CCCTCATCACCAACAGTGCGACGTATCCGAAATCTGCCAACGAATCAAC CCACAACCTCAAACCTG

# Anhang

dll_3' TC009351 iB_09187	CACGAGTTCGGTGCAATATGAAGTAAGACGATTCAATCAACAATTAACGT CTTGTGTAAATTTATTTTCCTATCGGTGACGTTTTGTTGGTTTAGTTGTTGC GCTTTTTCATTCCACGCATCAGTTTGTAAAGATAGTGATACGACGTACTAGC GGAATTCGTAAATAAATCCGTGGTATAAAAGTGATTGGCGTTTTGAGGTT TCGTGTAATTTTACAATATTGTTTCGAACCTTTCACGA
dll_5' TC009351 XX-90412-2	TAGATGGTTGGTTTAGAGCGAGCAATTTTCGCCGTAAAAAACGCCAATT TCGTGTAATTTGGTTTCGGGTTAATCTTCGGATCGTTCTGAGTCAATTACA CGTATTATCGCGGTAATTGTGCGGACGCGTGTTCGTAGTGCTTCCAGC AGGTGCTCAATGTGTTGAAGCGGAGCGTCTCCAAAGTGGATAACAAACCC TTCACGACGCTGAATTTACGGACTTGGGGTCCCCGTTCTGGGGGGCCTAA CGAGGAGCCGCCGGGGACGCCCAACAC
dll_CD TC009351 XX-90412-1	CCATGCACCAGAACTCCTACACGGGATACCATTTAGGATCGTATGCGGCC AATTGTCCGCCTTCGCCCCAAGATGATGAAAAGTGTTTATCGTTGGAGAG GCCGTCCGGCGGCGGCAAGGGCAAGAAGATGAGGAAACCGAGAACAAAT CTATTCAAGTCTTCAGTCCAAACAGTTGAACCGGCGGTTTCAAAGAACGC AGTACCTGGCCTTGCCCGAAAGGGCCGAATTAGCAGCCAGTTTAGGTTTA ACGCAAACCCAGGTCAAATATGGTTTCAAATAGAAGAAGCAAGTACA AGAAGATGATGAAGGCGGCG
dsh TC014903 iB_02346	AGAAATCCGCGATCGTATGTGGTTGAAAATAACAATACCGAATGCGTTTA TCGGTACAGATATGATCGATTGGTTGTTGACGCATGTTGACGGCTTTCAG GAGCGTCGCGACGCTCGTAAATACGCGTCACATTTACTCAAAGCCGGATT TATAAGACATACAGTGAATAAAATAACGTTTTTCGGAACAATGTTATTATA TTTTCGGAGATTTGTGTTTCGGCGATGAATAATTTGAAAATACAAGGGGAT ACGGATTTCGGTTGGACCTTTGCCAAATGTACCGAATTATATGCCGTATAG TGGGACGTATAATCCGTTGGAATACATGCCAATGCCGTTTTA
ffl_1 TC032552 XX-90314-1	TGATTACAGCACTTCCGACACGTGTAGCTGCTCAGATTGCTGCACTTCCG ACAGCTTTTTCTCTTCGGACTATGAAACCACCGACAGCGACGACTGCTGT GCTGCTCCAAGAAGAGGATGCCCAAGGCGTTAAATGTACTTACAACGCTG GTCGTTATTTTAATTTGTTATGTAAGTTAGTGTATTTAAGTACTAGTTTAA GTGTTTGACATGTGTATTATCTAAAATGTTTTAAATTTTCATTGATTCCATT GATGTTTGCTACTGAATATGTTATGTAATGTATTACTGATGATAAATGAA TAAAGCTTTCTAACGAA
ffl_2 TC032552 XX-90314-2	ACGGAGAAGATACCGCAATTAATAGTACCACGTTTGTCAGTCAAGTCGAA AATACTTCAGAAATGCCTGGTTGCACTTCTCGTAGCTCTTGTGCTTCTTGCC CCAAGACTACAAAACCCAAAGCTAAATCATCGACCAAGGTCAAGAAACC GGCAGCGAAAAAATCCACTACAAAATCTACAACGAAGAGGAGATCTGCT GCTTGCTCTCCTTGCGGCCCTTGCGGTTCTTGTGGTCCTTGTGGTCCCAAG AAAGCCAAGTCAAGCACGAAGTACAAGAAAGCTAAAGCACCCCGCCGCC GCCGTGCGACCACCAACTGTT
ff2_1 TC030881 XX-90313-3	TACTAAAAATTTAAAGAGGACAGTAAAGTGTAAGTAGGACGTACGACAAT ATAATTCGGGTGAGTTTAGAATGCCTGGTCACACCTCTTGTGCTTCTTGTC CTTCGTGCTCCAAGAATACAGAACACAAAACCAATCATCAAAGGTGAA AAAACGAACAACAAAAGAAGATCTCGTGGTGCAGACTCTCCGTGTTGTT CTTGCGCGAAAAAAACCAGGAGTACGAAGTTGAAGAAAAGAGCTCGCTG CTGTTGTAGTTGTACCAACAAGTGTGCAAATACAGCCCC
ff2_2 TC030881 XX-90313-2	TCTTCCGAAGATAGCACCGATACGGCGTGTAGCTGCTCAGATTGCTCCTC TGCGAGTCCCACTTCCGATAGTTTCTTTTCTTCGGATTATGAAACTACCGA CAGCGACAGCGGCAGCGAAGACTGTGGGGCTACCCCATCAAAAAGATGT ACGTGCAGGCGTTAAGTGCTGTTTAAACGCTGGTCGTGATTGCTTTTTTCT TAGTTGTGTAATTTTAGTGTGCAATTCAGAAACTGTGTATTAACCTGAGTA TTATGTAAAGATGATAAAGTAATAATAAAGCAGGTAGAGGTA

# Anhang

Myosin/ zipper TC034132 iB_03972	GCGCCAAAGGAATGTTTAGAACTGTTTCGTATTTGTATAAAGAACAGTTG GCTAACCTTATGGTGACTTTGCGTAACACCAATCCAACTTCGTACGTTGT ATTATCCCTAACCACGAAAAACGGGCGGGAAAAATCGATGCTCCTTTGGT TTTGACCAACTGAGGTGTAATGGTGTCCTTGAAGGCATCCGAATTTGCC GGCAAGGTTTCCCCAATAGAATACCATTCCAGGAGTTTAGGCAAAGATAC GAACTTTTGACACCGAATGTCATTAACAAGGGTTTCATGGACGGTAAGAA GGCCTGCGAGACCATGATCAAAAAGTCTGGAAGTGGACCAGAACTTGTAC AGAATCGGCCAATCGAAGATTTTCTTCCGCGCCGGTGTGTTTGGCACATTTG GAGGAAGAACGCGATTACAAAATCACCGATTTGATCGTAAATTTCCAAGC GTTCTGTCGCGGTTTCTTGT
PTK7/otk TC032332 iB_03542	GCCACCAACAGTCAAGGAGTTATCAACGTGACGATAAACATCGATGTTGT TGTGGCACCTAAATTTAGCGTGGAACCGAAAAACCCAACCGAAGTCACC GAAGGACAGTCGGTGACGATTGACTGTGTCGTGGAAGGCGACCCCAAAC CGACCATTCAATTGGGACAGAATTTAAAAATGAATGATTTTGATCACTCG AGGTTTACTGTTTGGAGAATGGGACTTTGTTTCATAAGTGAAGTGCACCG AGAGGATGAAAATAAGTACGGTTGCACTGCTGGAATAGCGCTGGTTTG AATCGACAAGAAGTACAACCTGATTGTTTCATTACGTGATGGCTACCACCC TGATGGAGATTCCACCGTAACCAAAGCGGTGCTAATTACGATGTCGGTAG CTGGGGCTTATATTGTTCTAGTTATTGGGCTCATGGTATGGTGCAGGTACC GAAGAAGGTCCAGAAAATTACCAGTTACTGATGCTGCGAAAACTGAAAA TG
RhoGEF 10 TC001759 iB_02957	AAATGCTTGAAAGCCGAGATGAAAAAACCCGAAACTGGGCGCAAAAGCCA ACTAAGCAATGACCTGAAATTCCTCGAGGACTTGTCGTTACAAAATCGGG ACGTTAAGTTGAAACACCGGCCAAGGTGTGACGACTCGAAGGGAAAGTTG TAATAATTTAAGTTCGCCGAAACAGTTGCTAACGTTATCGAAACGGAAAG TTAGTGCTGATAGTTTAGTTGTGGAGAATGATCAAAGGTTGGTTGTTAAT CACCAACGTACCCTTCGAGTCCCTCAAATTGGAGGGGTTCCGCCAATAC TGAAGTTTCGCAGGAATTGCTGGAGCAGCTGTTGAGGGGAAGTTCGGAAC AACTTGCCACCGATGCCAATTTACAGCAGAAAAATGATACGAGAACGCA CGTGTTGTGCGAGCTTTACGATAACGAGAGGACTTACGTGCAAGCATTAC AGATTCTGGTCACGAAATATTTGGAACCGCTTAAAGCCCCGAAAACACC AATCTTTTAGACGCGACACTTGTTGATG
RhoGEF 18 TC009420 iB_08587	AGGCAAAATGTTTCGCAAAACACTGAGATAATGTAGACTTATTGTAGAAA AACTACTTAAAATGTATCAAAAGTAGTGTCGTTAGTGTTTTATTTTGA TTTACAAGATCAATTGTATTACAAGAAATCTGTGAGTACTTTTTGTGTATG TATTGTGTGTAAAGTGTGACTTTTTCTTTGCTGTTTG
RhoGEF/ intersectin-2 TC032394 iB_09756	GGGGACTCAATTCACATTCCAAAGAAATAGTAATATAAGTTATAAAATGT ACAAACAACCTATTTTAATACAAGATCTTTCGTTTAGTCGAGAGAGCACC GACCATGTAGAACAAGGAACCGACTCCAATAGAGTTATCAAAATACAAG ACAATAAAAATAAGTATACTTTAAGTTTGTGGCGCCTACAGTGAATGAA TGCAACTTGTGGGTAAACGCATCGAAAAAG
RhoGEF2 TC032343 iB_03492	CAGCTCTGACGACGGTTTTGTTGTCATCTTTGGTATTTCGGCCGGCTTCGC ATACCATCGATCGCTGTCCAACCTTTTGTAACAAGGAGAAGTCGTTCCGC ACGAAATTTATTGGAAGATATTCCCGAAAAGTTAAACGTTCAAGGACACCA ATACGTCGCACAACAATATTATACTGTGATAGTTTGTAATAATTGCCATC AAATTATTTATGGAATAGGACCTCAAGGCTATCAGTGTTCTGTTTGTGTA TTAATCTTCACCGTCCCTGTGTCAAGTTGTATGACGACAGTTGTCCAGGTC CAATCAATAAAAAGGATCGGGGCT
RhoGEF64C TC003783 iB_00613	CAGTCGCGATTTGCAGATTATTTTGGAGGAGTTTACCAACCGATGTTAGT GGCTGGGTTATTGACGCCGGAGCAACTATCGGCGATTTTCCTCAACGTGG AGGAACTTCTGGAAAACAGTCAAAGTCTGGCGGAACGGTTGCGAGACGC TGTGGAAATTGCAGTCGAACAAGGAGATGAAGATCTCCTAACTGTTAACA TCGGGAAGATTTTCTGAGGGCGGCCCCCATGTTGCACGATTTGAGACC TATTGCGTCCGGCAAGGCGCAGCAAGTCTGCTTTTAGCTAGTCTAGAGAA GGAAAAAGAGCTCCTCAGGATATTCTCCGGGTGTCGAAATGGAGAAC ACGATGCTGAGAAGGATGAATTTGAATTCGTTCTCATGGTACCTGTCCA ACGTGTCACTAAATACCCGCTGTTGTTGGCGCGGTTGTATAAGGTTACGC CGGTGCACCACGAGACGAGGGAACAGTTGAAGGAAGCGCAACACAAGAT TGA

# Anhang

RhoGEF2 TC003070 iB_00510	AAACGAAAAGGCATGAGTCGCAGCCTGACTCAGACGAGTCGGAAACTTT GCAGGAAATTCCCAGTACGCGAGATGTTGCCGAGAGGGCTGAAGCCGTC GGTGGAACGGATAATACTCCTGATGATGAAGAGGAGGACGAACAAATCT TCAGTGATGCTCAGGAGGAAGGATCTACGGAGCAGAAGGAGGTTCCGAG CTCGTCGGAAGGTGGCGGTGTTACACCAAAGTAACAGCGGATGAGTGG CCTCTCATCCAGCCTTCACAGGTCCACGTAGAAAGTACCACCAGTGCACAC TGCTGAGTCAAGGTAACTCCACTAGAACAAATTCGTCGTAAAGATGAAG AAGTGCGCCGAGCGTTAGAAGACAAAGAGGGCCTGGTTGCCGACCTTTTG AGTATTCCTCGGGAGCACTTCCAATTATTGCTGATATGGCCAGTGATAC ACAAGACACGCGGTCTTCCAAAGACCTAGCGGAGCGCGTATTGGCTGCCG TATAT
ror1 TC015667 iB_05864	TGGTCATTTTCGCAGTCAAACGATATTTTCATCGAGTTGTAATAAATTTCGCAC GTCCAAGTTTGTGTTATTCGGCGTTTCCTTTGTGTACCGATCCGAAACAAA TAAATATGTATCAGACGACGAAATGGATCGGTTTAAGTTAGATAAATGTC GGTTTAAAGAATTTGAGGAATAAATTGGGGAGTTTCGTTGAGGAGGATTTG TAAAGAGGATTGTCTTTTGTAGAGACTGAGTTGTGTAGTAAGGAATATG CGATTGCGAAACGACATCCAGTTATTGGAAGACTTTGGAATTGGAGGAG TGTCAGTTTTTGCCGAATGAGACCGAAGTCAGTTCGAGAAATTGTCTCGA GTTGGGTGTCGATCATGAAAGTGTTAATAAAGAGGATACGTGTTATTGGG ACAACGGCGAACTATACAGGGGTGTTCAAAATATGAGCGAACTTGGTAA CAAATGTTTAAAGGTGGGCCCCACCAATTCCACATCCATTTATCCGAACACC CGGAACTGACAGGTCATAATTATTGTCGTAATCCAGGTGGC
ror1 TC015667 iB_05864_2	TTGTTTGTGGGAGTTGTGGTAAAACAGGAACCTATGTGTATGTTGTTTGA ATTCATGTCAGAAGGTGATTTGCATGAATTTTGTATCTCAAATTCGCCAAG TGAAGGTAAAAGTTTGACACAGAACCAATTTTACATATCGCCATACAGA TCGCACAAGGAATGGAATATCTGTCCGATAATCATTATGTTTCATAGGGAT TTGGCGGCGAGGAATTGTTTAGTTTCCAAAGATTGGTTGTTAAAATTAG CGATTTTGGACTCAGTAGAGATATGTACAGTTGCGACTACTACCGG
ror2 TC014181 iB_05579	GGGGGCAAGATATGTGAAATTACGTGGGACATTCGAAGATGGTGTGGT TCAATAATTCCGGGAGGTTTTGAGAATGAGGAGATAACCAAGGCGCTTTGG AGGGAAGTTATCGAGACTTTTAATGAACCTTGTCGCCGAGCAGCTGAAAA ATTGTTATGTTTCTATGCCTTTTCTGACTGCTACTTGGGCAACCCTCTTCCA CTGTGCCACGAAGATTGCATTGCAGTGAAGCAGCTATTCTGCTACAAGGA GTGGGCACATATTGAAGACAGGAAGTCCAATGGTTTCGTTTTCAAATCTA GGGGCCACTTCAGATTACCAGTTTGCGAAAAATTACCCAAATATCAAATC GTAAATAACACAGCGACATGTTTCATACGCCGGCCTCGTGGAGCTAAAAGT GGACGAAATAACACACGACTGTATTAAGGGACGCGGTCTGTTTCTATCAGG GCAACGTGAACGTGACCAAAGACGGCCTAGCTT
RYK/dnt TC010814 XX-90377-1	CTGTGGACAAAAGAGTCGTTTCGTTTCGGTGGAAGAAATAAGAGATTTCGT TGAATGTGGTGAGTGGTTCGGAATGTGGCTGCTGCGAACACAGACCGAAG ACTCGAAGAGGGCAAGCAGTGTGGCGTTGTTTTGGCTAAAAATGAAAG AATCATTAATTAATACTGACTGCAGTGTGATGTGCAATGTGAACTGTCCAC AACCTTTCGAAAAGATCGATCTCACTCGTTTATTTACAAAATGTGACTGA GAGTAATACTATCAATATGAATCAAAATTTCTGTCCGGGTTTATTATTTT ATTGACGTCGCAATTGGTTTT
Wnt5 TC009318 iB_04618	ACAAATCCGGCTCTGTCAATTGTACATGGACCATATGAATGCTGTGGCAT TGGGGGCTCGTCAGGCGCTATCCGAGTGTAACATCAGTTTGAAAATCGC AGGTGGAAGTGTCTTTACTGAATGACGTCAATGTCTTTGGTCCAGTTATA ACAATCGCTAGCCGCGAATCAGCATTTCACACGCTCTAGCTTCAGCCGG AGTGTCTTACGCCGTTTCAAGAGCTTGCAGAGATGGTCAACTTGCATCTT GTGGATGCTCAAGAATGGGACGACCAAAGGATTTACGAAAAGATTGGGT ATGGGGCGGATGTGGCGACAATTTAGAGTATGGATACAAATTCACACAA AACTTTGTAGACGTTTCGGGAAAAGGAACGCAAATTTAAGAGAGGATCCA AGGAGCAAGGACGCAACCTTATGAACTTGCACAACAACGAGGCTGGGAG AAGAGCAGTCATCAAGAAGTCGAAAGTTACTTGTAATGTCACGGAGTGT CAGGTTCTTGTTCTTTGATAACTTGCTGGCAGC

# Anhang

ZnF like TC003827 iB_07043	GGTTTGTGCAATTTTCGTCATTAATTCTCAAGTACTCCAAACATCTGTAAG CCAGTTGAACCGTAATAACATGAAAGTTGAATCCTACAATTTTGGTAACC AAGAATTTAGCTGCGGAACAAATTTCTTGAACCTTACAAGTGCAATTAC TGTGATTTTCACACAGATCTCTGGATTGATTTCAACAGTCATAAGAAAAC ACATTGCTTCCAAAAACTACCAATAGATCCAACAATTTATACGTGCAATA AGTGTGGTTTTAGAAGTTTTTCGATTTTACATCTACTGAGACATAATTTAG ATAGACACAAGTTGAACCATGAACATAAAACATACATAAGTTGGTACGT AAAAAGCCACTCTCTCAGGCACAGAAGTGAAGAACTGTATCAATGCAGTT TATGTGAGTACCAGTGCAATAAAAAATGGAATTTACAACGGCATGTTTTA AAACACTCAGCTTATAATAAAAGCTCTGAAAAAATTACAACTGTGAGCA TGTTTCACGGCAATTCTATTGCA
ZnF like TC015072 XX-90331-1	AAAACCTGCCCCTTTAAACAGCATCAGAGGCAGCTTTGAAAAACATATC GCAAGGAGACACCTATCGGGAAAATTGTTGCACGAGTGTCTCACTGTTT TTATACGACAAGGTTTCAGGGTTTATCTTACGCAACATGTCATAAGACAAC ATACCGATGCCGAAAACATTGAATGGTTCAAATGCGGGCATTGTGATTAC AAGGGGAAGCTTAAGGGGGATTGATGCGACATGTAAGGAAAGCGCATG AAAATGCCAAGATGTTTAGTTGCGATTTGTGTGAGTATAAGTCCAAGAGG AAGGATAATATTAAGAGGCAT
ZnF like TC015073 XX-90332-1	TCCGCATTGTTTTTTCACAACGCATCTTCCGTTTTTCCTGAAACGGCATAT AGTTGTTGAACACACTGAGCCTGGGGATATCAAGTGGTTCCAGTGCGAGC AGTGTGACTATAAAGGCCAACTTAGGTGTAATTTGACGAGACATATCAAG TCGGTGCATAAGAGTGGCGAGGCGGAGATGTTTCACTGTGATTTGTGCGA GTACAAGTCGAAGAAGAGGGGGAATGTTAAGAGGCATAAGATTAGTATA CATCTAGCTAAACAAAAAATTCAGGAGGTGTTGTG
ZnF like TC015074 XX-90333-1	AAAACACGTGGCTTTTAGACATAATCCATCCAAATTGTTGCACGAGTGCC CGCATTGTTTTTTCACGACCAGGTTTCGGACGTATTTGAACCAGCACATCA TCAGGGAGCATTTCGGATGTGGAAGCGGTCAAGTGGTTTGAGTGTGATCGG TGTGATTATAAGGGAAAGTTTAAGCAGTATTTGGTGAGGCATGTGAGGGC GGTGCATGAAAGTGATGAGACGAAGATGTTCAAGTGTGAGTTTTCGCGAGT ATAAGTCGAAAAGGAAGGAGAATGTTAAGAGGCATAAGTTTACCATGCA TTTGGGGAAGAAGGAAGCAG
ZnF zfx TC015629 iB_05852	TGGTTCAAGCACAATGTTTCGCAAAAATCTAGAAATTGGCGAATTTACATC ACCTCAAGCAACGCGTTTTGAATGCACTTATTGCCCATTTAAAGCCACCC AAAAAGGGTCGTTAAATCGCACATTCTCCGCAAAACACACCCCATCTGAC GAAATCCAATGGTCCCAATGCACACAATGCGCTTTCAAACCAAACTAAA AACATCGCTAAAAAGACACATCAAGCGCCAACACACCAACAGTGACGAA GTTCAAATCAAGTGTGACCTGTGCAATTATACAACAAACCGCCAAGATAA TTTAAGGAGACACAAAAGTTACAATCATTTGCCACCTAGTGTTATCCACG AGTGTAGGGAATGTCCGTTCAAGACGAAACATGGGGGCGACTTGAAGCG CCACCACATCAGACACCAGTAGCTTCCGAGGCCATAAGTTGGCACCCT GTCACCTTTGCCCCCACCAGTCTAAAACCCAGTCAGACTTGAAATCACAC ATTCGGTTAAACACGAGGG
ZnF zfx TC015629 iB_05852_2	CGTACAAGACCTCGCAACAAATTTCTCTCAAACGCCACATCATCAGACGC CACACAGCGCCTGAAGAAGTCGAGTGGTTTGAGTGTGACCAATGCAACTA CAAGGGCAAATGTAAAGAATATCTGCGTGATCACAAAAAATGCAACAC TCTGATAGCAGTGTCCAGAAGTTGGCTTGCAATGAGTGTCCGTTTAAAGAC AATCTCTGAGGACGATTTGAAAAAACATGTCGCTAAAAGACACTCTTCGA AGAAGTTGCACGAGTGTCCGCATTGTTTT
CDH like TC015717 iB_05882	TTCACCAAAACTCGCTACCAGACTTTTGCCGTGGCAATGGAATACATAGT GAATGAAAGGGGTCCGATGACCTCACTGGGAGGTGTGGAGGGGCTAGCG TTCGTCAACACGAAATATGCCCCAAAATCGGGGTCTGGCCCGACATACA ATTCCACTTCGCCCCCTCCAGTATAAATTCGGATGGGGAACAAGTGAAAA AAATCACAGGATTGCGAGACAGTGTGTACAACACTGTGTACAAACCCCTT AAAAACGCCGAGACTTGGACCATTCTACCCCTTTTACTCAGACCCAGGAG CACGGGTTGGGTGCGTCTCAAGTCCAAAGACCCCAATATCTACCCCGACA TTAACCCCAATTACTTCACGCATAAAGAGGACATTTTGACTCTCACTGAA GGGATCAGGATTGCCCTAAACGTCTCAACACCCCAATCCTTCCAACGGTT CAATTCCCGACCCCATAAAATCCCGTTCCCGAAG

## Primersequenzen

Gen	Primer	Sequenz	TC
Aminopeptidase	TC_016224_1069RV	CGTACACTTCTCTCTGACTGGTG	TC016224
Aminopeptidase	TC_016224_545FW	GCGAGATGGAGAATTACTTGCAG	TC016224
Cdh	CDH1_155FW	CAACTCCAACCTGACTCCGAATA	TC010931
Cdh	CDH1_554RV	CCGACTTCTTGAAGTACTCCTCC	TC010931
Cdh	CDH2_1264RV	GAATTGCAAGTCGGGATTTTTC	TC010931
Cdh	CDH2_765FW	GATTAAGCAGTGCCAGAGCTTTC	TC010931
Cdh	Gld_FW_1145	AGTATTTGACGGAGAGAAGAGGC	TC010931
Cdh	Gld_RV_1756	GCATCACTGACGCATCCATAATC	TC010931
DipC2	TC_011562_52FW	GAGGATGACGAGTGGGAGACAG	TC011562
DipC2	TC_011562_679RV	TCCACAAGAAGTTGGATTCTCTGC	TC011562
Dipeptidase C	DipC_3'RACE_1715FW	AGCCGGGCGAGCGGACTGAACCA	TC031503
Dipeptidase C	TC_031503_1375RV	AGAGCTCTCCTTCCTTGATGAAC	TC031503
Dipeptidase C	TC_031503_726FW	CGATACTGACACCACGTACAATG	TC031503
DmCG30116	TC004796_FW_274	GTCGACAAAGTAGGAGAATTGGG	TC004796
DmCG30116	TC004796_RV_1164	GCGTCTAACGGATTGAGTAAATG	TC004796
Epac	RacGEF1_1634FW	AAGAGGAAGCCTCTCTAATGCAC	TC011926
Epac	RacGEF1_2281RV	CGACCCAGAATTGAATCTCGTTG	TC011926
expanded	ex_FW_1361	AAACCAAAGGCCCGCAGACCC	TC012545
expanded	ex_RV_2073	GCTTGCATGCGCTGTAGGATAC	TC012545
flipflop1	ff_ORF_FW-Nest	ACAAGAAAGCTAAAGCACCCCG	TC032552
flipflop1	ff_ORF_RV-Nest	CTTTCTTGGGACCACAAGGACCA	TC032552
flipflop1	ff1_3'RACE_143FW	GCTCTCCTTGCGGCCCTTGCGGT	TC032552
flipflop1	ff1_5'RACE_258RV	ACAGTTGGTGGTGCACGCGGCGC	TC032552
flipflop1	ff1_5'RACENest165RV	ACCGCAAGGGCCGCAAGGAGAGC	TC032552
flipflop2	ff2_3'RACE_104FW	CTCGTGGTGCAGACTCTCCGTGT	TC030881
flipflop2	ff2_5'RACE_337RV	CGCTGCCGCTGTCTGCTGTCGGTA	TC030881
flipflop2	ff2_TC030881_297RV	AAAGGAACTATCGGAAGTGGGAC	TC030881
flipflop2	ff2_TC030881_35FW	CGTGCTCCAAGAATACAGAACAC	TC030881
gartenzwerg	garz_1372fw	GAGGCCAGTCTCCATGGTAATAG	TC005830
gartenzwerg	garz_1822rv	CAATGTTACTCAAGAGGTGTGCC	TC005830
gartenzwerg	garz_TC005830_2628FW	CAATTTGCAAAGACCGAACAACG	TC005830
gartenzwerg	garz_TC005830_3268RV	GGTAGTCGAAGACTGAGGAGTTC	TC005830
Glut	TC006631_FW_215	GTTCTCTCGCTAACACTTCAAGC	TC006631
Glut	TC006631_RV_928	GAACGTCTTTCATGTACTTGGGC	TC006631
hemipterous	Hemi_Fw83	GGCCACGAGATTTATCTTTCACG	TC000385
hemipterous	Hemi_Rv836	CGGTTGTACAGTTGGGATATGG	TC000385
Kalirin	Kal_FW22	CTTTTCCAGTGCGACACTCACG	TC003064
Kalirin	Kal_RV880	CTCTCCGCACAATGGAGAATCG	TC003064
KXR596	TC_007133_143fw	CATCTGCACAACTCAAGGAAGTGAAC	TC007133
KXR596	TC_007133_452rv	CGGCGTACATAAACTGTCTGAAACC	TC007133
KXR596	TC_007134_241fw	CACCAATCTTCCAACGGAGTCGATGTC	TC007134
KXR596	TC_007134_541rv	CAGCAGCCGGTTTCAGATGATCTCC	TC007134
MCM	MCM_FW436	CCC GTTGAAGAAATGGAAGTCG	TC003148
MCM	MCM_RV1200	CGGAGTTAGTTTCGTCTCGTCC	TC003148
Merlin	Mer_FW_361	CTCTCTATGGATGTGTACTGCCC	TC014860
Merlin	Mer_RV_1056	CTGTTCCATATTGGCCCTTTCAC	TC014860
minibrain	TC_007717_1341rv	ATTCATCTGATCGATTTTCGTTGGCACC	TC007717
minibrain	TC_007717_675fw	GAAGAATGGTGAAAAGTTCCTCGACCG	TC007717
pavarotti	pav_TC013058_298FW	AACGCCCTACTCTTCACTTATGG	TC013058
pavarotti	pav_TC013058_875RV	ATTGAGTGACTCCGACTTGAGAC	TC013058
Prat2	TC_016203_1495RV	CTTTCACCAAACCTTCCACACTC	TC016203
Prat2	TC_016203_926FW	CCTTCTGCATCTTCGAATACGTG	TC016203
RhoKv	RhoKv_FW1003	CAAGAACTCGACGACACAATCG	TC014703
RhoKv	RhoKv_RV1689	GATGTTGTACACGTCGAAACCG	TC014703
PP1	TC_012424_387rv	CAGAGTCTTTGCTTTGTCCAACAGATCG	TC012424



# Anhang

PP1	TC_012424_87fw	GAAGACGGGCCTCCACGTCAATTC	TC012424
rap1	Rap1_TC006305_1029RV	GTCTTTGAACACCTCGTAAACCG	TC006305
rap1	Rap1_TC006305_499FW	GATACCGGAAAGTGCTACAGGAG	TC006305
rap1	Rap1_X1_1069rv	CTCGCAACCTGATGATTTCTTC	TC034036
rap1	Rap1_X1_545fw	ATTTAGCTAATGCGAACGGACAC	TC034036
Rho kinase	RhoKh_FW6574	ACTATTAGCAACTTCCAGGCC	TC014705
Rho kinase	RhoKh_RV7231	ACCTTCGACACTCTAAAGCAGG	TC014705
RhoGEF2	Rho69_3'Nestin2619FW	GCCCTGCGCGTTCTCGTTGCCAG	TC032343
RhoGEF2	Rho69_3'RACE_2598FW	ACCGGCGCATAGTCCACCGGAGC	TC032343
RhoGEF2	Rho70_5'RACE_356RV	CCGCTCACCGCTCGCGTCAAACG	TC003070
RhoGEF2	TC_003069_33fw	CAAGTTGTATGACGACAGTTGTCCAGG	TC032343
RhoGEF2	TC_003070_850rv	GATCACTCAAGCGTCTCCCTTTCTTTG	TC003070
RhoGEF2	TC003070_FW_879	CGCTGATATGGAAGATGGCATTG	TC003070
RhoGEF2	TC003070_RV_1849	GCT TAA GCA TAT CGC CCA CAA C	TC003070
RhoGEF2_ges	TC003070_1150RV	TTCGTGACACGGGTTGACTGGGCTTA	TC003070
RhoGEF2_ges	TC003070_1296RV	ATGAGAGGCTTGCGGGAACTAGCGA	TC003070
RhoGEF2_ges	TC032343_2479FW	ATGGAAAGGGAAAGGAGGCAAGCCGA	TC032343
Riquiqui	TC_012028_232fw	AAAATCATGTGGATACCCGACAGCAAG	TC012028
Riquiqui	TC_012028_981rv	CCACTGTATTTGATTGACTTCGCCCTC	TC012028
Ror1	ROR1_2385FW	GTCCTCTGGGAGATCTACAGCTA	TC015667
Ror1	ROR1_2856RV	CAATCGTGTTTTTGGGGCTCATC	TC015667
Ror1	ROR2_401FW	CCTGGACCTAAACAACACAAACC	TC015667
Ror1	ROR2_820RV	CACGTCTCCCCTAGATACACTTG	TC015667
scalloped	sd_FW_472	GGTCTGAGTCTTGGTCTAACTCC	TC032219
scalloped	sd_RV_1255	CAAGCCTGTAGATGTGATGTTGG	TC032219
shox	Shox_Fw142	GCAAAACGACCCAAAAATTGGC	TC001726
shox	Shox_Rv754	CTTTCTGAATTTGGCTTTCGTGC	TC001726
Trio	TrioM_FW3835	GAAACGTGCATCAAATGCTTCC	TC003063
Trio	TrioM_RV4623	CCAGAGTTGTTTCGTTTCCAG C	TC003063
Trio	TrioV_FW1447	CCAGGAAGTGACAAGAAACATGG	TC003063
Trio	TrioV_RV2276	CAGAGATCTAAGCGCAGTTTGC	TC003063
tumbleweed	tum_176fw	CGGCGCAATTTGATGATTTGATG	TC010549
tumbleweed	tum_432rv	CTTCCTGGCTGTCCTAACCATTA	TC010549
tumbleweed	tum_TC010549_1124FW	AAGCTCTGTGTCAATTGGAATGC	TC010549
tumbleweed	tum_TC010549_1813RV	GTTGATAAGTCGGCTCGATGTTG	TC010549
unc-4 like	TC_005661_1027rv	CTATACTGAAGGGGTTAAGTCTGCGGG	TC005661
unc-4 like	TC_005661_565fw	GCCATGCGACTAGACTTAAAGGAAAGC	TC005661
uncharacterised	Jaws_Fw130	GTAGATAGAGACTCATCGGCTGC	TC003497
uncharacterised	Jaws_Rv1024	GTTGTCAATTTACCTCCCACTGC	TC003497
uncharacterised	TC002426_FW_287	CGTTCGTCTACAACGACTTGTTTC	TC002426
uncharacterised	TC002426_RV_1171	CATCGTCTGAAATGGTAGTTGGC	TC002426
armadillo-like	TC000592_FW_1498	GTTGATAAACTAGCGACGAGCAC	TC000592
armadillo-like	TC000592_RV_2172	CTTGAAGGTGTGCAACTTATCCG	TC000592
Vector pBst	pBst KS_BlueRV_T7	GAAATTAATACGACTCACAATCGCGGAG GTACCGGGCCCCCCTCGAG	
Vector pBst	pBstKS_Blue_FW_T7	GAAATTAATACGACTCACAATCGCGGAG TGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGC	
Vector TOPO	pCR4 Topo_FW_T7	GAAATTAATACGACTCACAATCGCGGAG ACCATGATTACGCCAAGCTCAG	
Vector TOPO	pCR4 TOPO_RV_T7	GAAATTAATACGACTCACAATCGCGGAG GGCGAATTGAATTTAGCGGCCGC	
yorkie	yki_FW_479	ACATAACTCGGACCACAACCTGG	TC004769
yorkie	yki_RV_1082	GGCACTAAATCCTCCGTACAATC	TC004769

## Massenspektrometrische Proteinanalysen *Tc*-FF1 und *Tc*-FF2

Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
au3.g873.t1	1970,94	50,78	1	68	68	557	1788	203,7	7,40
au3.g5450.t1	1428,71	50,51	1	22	22	412	392	44,8	6,64
au3.g721.t1	1362,05	52,09	1	68	68	387	1791	203,9	7,53
au3.g8362.t1	392,75	31,99	1	16	23	112	966	107,9	5,77
au3.g9941.t1	286,66	57,98	1	15	15	80	376	41,8	5,48
au3.g7734.t1	201,94	13,64	1	37	37	60	3313	367,7	8,19
au3.g2203.t1	153,81	49,62	1	18	18	41	391	43,8	5,63
au3.g8366.t1	122,48	15,10	1	2	9	37	715	80,1	6,54
au3.g11676.t1	113,42	45,73	1	13	13	34	433	47,0	6,96
au3.g5378.t1	114,96	45,22	1	18	18	32	429	49,1	8,63
au3.g5019.t1	86,49	38,60	1	13	13	28	443	49,9	5,60
au3.g11787.t1	100,45	42,65	1	15	16	28	408	46,0	7,87
au3.g5813.t1	100,15	35,50	2	14	14	28	400	45,5	6,46
au3.g11842.t1	104,08	36,18	1	9	10	28	398	44,8	8,18
au3.g6933.t1	81,24	31,93	1	13	13	27	404	45,5	11,56
au3.g7517.t1	79,97	54,32	1	20	20	23	440	47,0	7,62
au3.g11793.t1	75,45	45,83	1	15	15	23	515	54,7	7,91
au3.g6338.t1	83,36	37,97	1	13	13	23	482	52,5	8,18
au3.g11722.t1	74,01	8,15	1	14	14	22	2282	263,6	5,71
au3.g10076.t1	67,19	18,88	1	6	10	19	1213	136,2	5,83
au3.g1691.t1	57,80	40,56	1	11	11	17	392	44,5	7,03
au3.g11480.t1	60,58	36,80	1	12	12	17	413	46,7	6,67
au3.g5930.t1	56,42	32,02	2	11	11	16	431	48,1	7,78

Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
au3.g721.t1	1844,45	38,30	1	52	52	535	1791	203,9	7,53
au3.g873.t1	1123,32	26,06	1	36	36	352	1788	203,7	7,40
au3.g3292.t1	324,30	64,75	1	12	12	94	122	14,1	7,78
au3.g1936.t1	170,35	41,63	1	6	6	66	209	22,5	9,20
au3.g7354.t2	178,38	75,00	2	9	9	63	136	15,1	6,01
au3.g5450.t1	178,95	38,27	1	11	11	54	392	44,8	6,64
au3.g273.t1	146,39	49,61	1	7	7	43	129	14,4	6,71
au3.g272.t1	123,23	39,85	1	6	6	37	133	14,9	7,12
au3.g4414.t1	110,89	60,39	1	7	7	31	154	17,2	9,16
au3.g8194.t1	100,39	50,00	1	6	6	26	140	14,7	10,54
au3.g6220.t1	69,71	52,38	1	4	4	19	126	13,8	7,24
au3.g8842.t1	68,60	50,00	1	6	6	19	108	11,6	7,34
au3.g11039.t1	62,06	47,69	1	5	5	18	130	14,8	10,07
au3.g5746.t1	59,95	59,48	1	7	7	17	153	15,7	6,74
au3.g7734.t1	56,31	3,92	1	9	9	17	3313	367,7	8,19
au3.g8916.t1	51,75	11,98	1	13	13	16	1761	199,4	7,21
au3.g9941.t1	56,65	13,56	1	4	4	15	376	41,8	5,48
au3.g7972.t1	44,80	36,48	1	8	8	14	244	27,9	8,28
au3.g1090.t1	45,04	41,06	1	4	4	14	151	17,2	6,01
au3.g9290.t1	45,04	45,45	1	7	7	13	132	14,8	7,72
au3.g2949.t1	40,49	25,93	1	4	4	12	162	19,0	5,41
au3.g7242.t1	47,05	49,52	1	3	3	12	105	11,9	4,74
au3.g8311.t1	37,82	59,29	1	8	8	12	140	15,1	5,85
au3.g7868.t1	33,61	34,85	2	4	4	12	132	15,1	9,22
au3.g3595.t1	40,69	18,90	1	2	2	11	127	14,0	7,85
au3.g9137.t1	32,95	34,63	3	2	2	10	670	75,4	8,03
au3.g10070.t1	32,94	9,50	1	3	3	10	379	42,7	8,16
au3.g3932.t1	30,05	27,65	1	5	5	9	217	24,8	6,54
au3.g7885.t1	30,66	29,08	1	6	6	9	196	21,8	6,79
au3.g9391.t1	28,49	4,69	1	5	5	9	916	104,8	6,96
au3.g1992.t1	28,42	24,89	1	6	6	8	450	49,9	5,14

### **3. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift